

# **Rekombinante Antikörper für „Lab-on-chip“**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer

Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Laila Al-Halabi  
aus Bramsche

1. Referent:	Professor Dr. Stefan Dübel
2. Referent:	apl. Professor Dr. Peter Paul Müller
eingereicht am:	23.09.08
mündliche Prüfung (Disputation) am:	15.12.08

Druckjahr 2009

## **Vorveröffentlichungen der Dissertation**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

## **Publikationen**

Schirrmann, T., Al-Halabi, L., Dübel, S., Hust, M. Production systems for recombinant antibodies. *Frontiers in Bioscience* 13, 4576-4594 (2008)

Jordan, E., Al-Halabi, L., Schirrmann, T., Hust, M. and Dübel, S. Production of single chain Fab (scFab) in *Bacillus megaterium*. *Microbial Cell Factories* 6:38 (2007)

## **Tagungsbeiträge**

Michalzik, M.; Al-Halabi, L.; Balck, A.; Hust, M.; Dübel, S.; Büttgenbach S.: A mass sensitive microfluidic immunosensor for CRP-detection using functional monolayers. (Poster) *Biosensors 2008*, Shanghai, P1.72 (2008)

Michalzik, M.; Balck, A.; Al-Halabi, L.; Hust, M.; Dübel, S.; Büttgenbach, S.: Massenfließsystem zur CRP-Diagnostik (Poster) *Proc. Mikrosystemtechnikkongress 2007*, Dresden, 939-942 (2007)

Al-Halabi, L., Michalzik, M., Balck, A., Hust, M.; Büttgenbach S., Dübel, S.: Microfluidic Antibody Lab-on-chips (Vortrag) *Braunschweig Antibody-Workshop* (2006)

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dübel für die Möglichkeit zur Promotion und die wissenschaftliche Betreuung, sowie für seine Bereitschaft zu fachlichen Diskussionen und das Vertrauen, das er in mich setzte.

Bei Herrn PD Dr. Müller bedanke ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Herrn Prof. Dr. Steinert danke ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Herrn Dr. Thomas Schirrmann und Herrn Dr. Michael Hust danke ich für die hilfreiche Unterstützung, für ihre konstruktiven Beiträge sowie für Korrekturen an der schriftlichen Ausfertigung meiner Arbeit. Ihnen und allen anderen Kollegen der Arbeitsgruppen von Herrn Prof. Dr. Dübel, Herrn Prof. Dr. Lang und Herrn PD Dr. Rau, sowie allen „institutslosen“ Mitarbeitern in unseren Räumen danke ich für die einzigartige, tolle Arbeitsatmosphäre. Den (ehemaligen) Studenten Miriam Steinwand, Tobias Baumann, Simone Nieswandt und Claas Sehle danke ich für die praktische Unterstützung bei den Experimenten.

Herrn Prof. Dr. Büttgenbach, Frau Monika Michalzik und Frau Anne Balck des Instituts für Mikrotechnologie der TU Braunschweig danke ich sehr für die Generierung der Quarzsensoren, den Messungen an den Quarzsensoren und der produktiven Mitarbeit an dem Projekt.

Bei Herrn Dr. Ronald Frank und seinen Mitarbeitern der Abteilung Chemische Biologie des HZI bedanke ich mich für die Synthese und Bereitstellung der Peptidmembranen für die Epitopbestimmungen.

Herrn Erik Heim des EMG der TU Braunschweig danke ich für die Durchführung der Rasterkraftelektronenmikroskopie-Messungen.

Mein größter Dank geht an meine Familien und meine Freunde, insbesondere an meine Eltern und meinen Bruder für ihr Vertrauen, Interesse und ihre liebevolle Unterstützung.

Mein allergrößter Dank geht dabei an André Frenzel für seine stetige Präsenz und für die bisher schönsten Jahre meines Lebens.

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Antikörper und rekombinante Antikörper-Fragmente	1
1.2	Phagen Display	4
1.3	C-reaktives Protein (CRP)	7
1.4	Lab-on-chips	9
1.5	Zielsetzung	11
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>12</b>
2.1	Material	12
2.1.1	Antikörpergen-Bibliotheken	12
2.1.2	Bakterienstämme, Bakteriophagen und Zelllinien	12
2.1.3	Plasmide	12
2.1.4	Oligonukleotide	13
2.1.5	Enzyme	13
2.1.6	Antikörper	13
2.1.7	Chemikalien	14
2.1.8	Puffer und Lösungen	14
2.1.9	Nährmedien und Supplemente	16
2.1.10	Kit-Systeme	17
2.1.11	Verbrauchsmaterialien	17
2.1.12	Laborgeräte und Zubehör	17
2.1.13	Computerprogramme und Datenbanken	19
2.1.14	Sonstiges	19
2.2	Mikrobiologische Methoden	20
2.2.1	Anzucht von Bakterienstämmen	20
2.2.2	Bestimmung der OD <sub>600</sub> von Bakterienkulturen	20
2.2.3	Anlegen von Glycerinstocks	20
2.2.4	Herstellung chemokompetenter Zellen	20
2.2.5	Transformation von <i>E. coli</i> XL-1 Blue mittels Hitzeschock	21
2.2.6	Produktion von scFv	21
2.2.7	Produktion von scFv in Mikrotiterplatten	21
2.3	Molekularbiologische Methoden	22
2.3.1	Präparation von <i>E. coli</i> XL-1 Blue Plasmid-DNA	22
2.3.2	Präparation von <i>E. coli</i> XL-1 Blue Plasmid-DNA mittels <i>Qiagen® Plasmid Midi Kit (100)</i> Kit	22
2.3.3	Amplifikation von DNA via Kolonie-PCR	22

2.3.4	Restriktionsverdau	23
2.3.5	Dephosphorylierung endständiger 5'-DNA-Phosphatgruppen	24
2.3.6	Ligation von DNA-Fragmenten	24
2.3.7	Agarose-Gelelektrophorese	24
2.3.8	Aufreinigung von DNA aus Lösungen und Agarosegelen	25
2.3.9	Quantifizierung von DNA in Lösungen	25
2.3.10	Präzipitation von DNA aus Lösungen	25
2.3.11	Sequenzierung von Plasmid-DNA und DNA-Fragmenten (modifiziert nach Sanger <i>et al.</i> , 1975)	25
2.4	Generierung humaner rekombinanter Antikörperfragmente	26
2.4.1	Herstellung von M13-Phagen	26
2.4.2	Titerbestimmung von M13-Phagen	27
2.4.3	Selektion scFv-präsentierender Phagen	27
2.5	Proteinbiochemische Methoden	28
2.5.1	Reinheitsbestimmung von CRP über analytische Gelausschlusschromatographie	28
2.5.2	Präparation von scFv aus dem Periplasma von <i>E. coli</i> XL-1 Blue	28
2.5.3	Fällung von scFv aus dem Kulturüberstand von <i>E. coli</i> XL-1 Blue	29
2.5.4	Indirekter Antigen-ELISA	29
2.5.5	<i>Human-Capture</i> -ELISA	30
2.5.6	CRP- <i>Sandwich</i> -ELISA	30
2.5.7	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	31
2.5.8	Silberfärbung von Polyacrylamidgelen	31
2.5.9	Western-Blot	32
2.5.10	Immunfärbung	32
2.5.11	Reinigung von scFv-Fc-Fusionsproteinen über Protein A	33
2.5.12	Reinigung von scFv über Nickel-Chelat-Sepharose	33
2.5.13	Bestimmung der Dissoziationskonstante $K_D$ mittels BIAcore2000	34
2.5.14	Bestimmung der Antigenbindestelle CRP-spezifischer scFv mittels BIAcore2000	34
2.5.15	Bestimmung der Antigenbindestelle CRP-spezifischer scFv mittels Peptidmembranen	34
2.5.16	Entfärben von Peptidmembranen	35
2.5.17	Kopplung von CRP-Peptiden an BSA	35
2.5.18	Kopplung von Antikörperfragmenten an Gold über DSP	36
2.5.19	Kopplung von Antikörperfragmenten an Gold über SAM	37

2.5.20	Kopplung von Antikörperfragmenten an Gold über 11-Mercaptoundecansäure	37
2.5.21	Rasterkraftmikroskopie von Goldoberflächen	37
2.5.22	Messung von CRP aus einer Lösung mit einer Quarzkristallmikrowaage	37
2.6	Zellbiologische Methoden	38
2.6.1	Kultivierung von HEK 293 T Zellen	38
2.6.2	Transfektion von HEK 293 T Zellen	38
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>39</b>
3.1	Gelfiltration des <i>Panning-Targets</i> C-reaktives Protein (CRP)	39
3.2	Selektionen von rekombinanten Antikörper-Fragmenten gegen CRP	39
3.3	Analyse von Einzelklonen aus den Antikörper-Selektionen gegen CRP	41
3.3.1	Produktion und proteinbiochemische Analyse	41
3.3.2	Sequenz-Analyse	42
3.4	Produktion CRP-spezifischer scFv-Fragmente in <i>E. coli</i>	43
3.4.1	Klonierung der scFv-Genfragmente in den Vektor pOPE101 für die Expression von scFv-Proteinen in <i>E. coli</i> XL-1 Blue MRF'	43
3.4.2	Expression und Aufreinigung CRP-spezifischer scFv in <i>E. coli</i> XL-1 Blue MRF'	43
3.5	Stabilitätsanalyse CRP-spezifischer scFv	44
3.6	Bestimmung der Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) CRP-spezifischer scFv mittels Oberflächenplasmonresonanz	45
3.7	Oberflächenplasmonresonanzanalyse CRP-spezifischer scFv mit unterschiedlichen Epitopen	47
3.8	Epitop-Bestimmung CRP-spezifischer scFv mit Peptidmembranen	50
3.9	Kopplung von CRP-Peptiden an BSA	52
3.10	Selektion von Antikörpern gegen CRP-Peptid-Epitope	54
3.11	Analyse von Einzelklonen aus den Antikörper-Selektionen gegen CRP-Peptide im ELISA	55
3.11.1	Produktion und proteinbiochemische Analyse	55
3.11.2	Sequenz-Analyse	57
3.12	Kopplung unterschiedlicher Antikörperformate an Goldoberflächen	58
3.12.1	Generierung CRP-spezifischer scFv mit einer C-terminalen Thiol-Gruppe	58
3.12.2	Generierung CRP-spezifischer scFv-Fc-Fusionsproteine und Produktion in HEK293T Zellen	59
3.13	Untersuchung der Parameter für die Kopplung unterschiedlicher Antikörperformate an Gold	61

3.14	Messung von CRP in einer Lösung in einem mikrofluidischen System	64
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>66</b>
4.1	Humane rekombinante Antikörper gegen CRP	66
4.2	Selektion von humanen rekombinanten Antikörperfragmenten gegen CRP-Peptide	73
4.3	Kopplung von scFv an Goldoberflächen	74
4.4	„Lab-on-chip“-Systeme für die Serumdiagnostik von CRP	76
4.5	Ausblick	79
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>81</b>
	<b>Summary</b>	<b>82</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>83</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang</b>	<b>95</b>
7.1	Vektorkarten	95
7.2	Sequenzen der Peptidmembranen	97



## Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$	anti
A	Ampicillin, Ampere
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serum Albumin
BSG	Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit
CBS	<i>Citrate-buffered saline</i> , Citratpuffer
CDR	<i>Complementarity determining region</i> , komplementaritätsbestimmende Region
cfu	<i>Colony-forming unit</i> , koloniebildende Einheit
CL	Konstante Region der leichten Kette
CH	Konstante Region der schweren Kette
CMV	<i>Cytomegalovirus</i> , Zytomegalievirus
CRP	C-reaktives Protein
C-terminal	Carboxylgruppen-terminal
Da	Dalton
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle Medium</i>
DMF	N, N-Dimethylformamid
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
DSP	Dithiobis-(succinimidylpropionat)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamin-N, N, N', N'-Tetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> , enzymgekoppelter Immunoassay
F'	Fertilitäts-Plasmid
Fab	<i>Fragment antigen binding</i> , antigenbindendes Fragment
Fc	<i>Fragment crystallizable</i> , kristallisierbares Fragment
Fc $\gamma$ R	Rezeptor für Fc-Domänen von IgG
FCS	<i>Fetal calf serum</i> , fötales Kälberserum
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
FR	<i>Framework region</i> , Gerüstregion
Fv	<i>Fragment variable</i> , Variables Fragment
G	Glukose
g	Gramm
GMBS	N-[ $\gamma$ -maleimidobutyryloxy]sulfosuccinimid-Ester
x g	Multipliziert mit der Erdbeschleunigung
h	Stunde, <i>human</i>
HC	Schwere Kette eines Antikörpers
HEK	<i>Human embryonal kidney cells</i> , humane embryonale Nierenzellen
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> , Meerrettich-Peroxidase
Hz	Hertz
Ig	Immunglobulin

## Abkürzungsverzeichnis

IL	Interleukin
IMAC	<i>Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography</i>
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalaktopyranosid
k	kilo
K	Kanamycin
$k_A$	Assoziationskonstante
$k_D$	Dissoziationskonstante
L	Liter
log	Logarithmus
LPIA	<i>Latex piezoelectric immunoassay</i>
m	milli
M	Molar, Mega-
M13	M13K07 Helferphagen
min	Minute
MOI	<i>Multiplicity of infection</i> , infektiöse Viruspartikel auf jede vorhandene Zelle
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
$\mu$	mikro
n	nano
N	Normal
NBT	Nitro-Blau Tetrazoliumchlorid
NHS	N-Hydroxysuccinimidyl
N-terminal	Aminogruppen-terminal
OD	Optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> , phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , Polymerase Ketten-Reaktion
PDMS	Polydimethylsiloxan
PEG	Polyethylenglykol
Phage	Bakteriophage
PVDF	Polyvinylidendifluorid
QCM	<i>Quartz crystal microbalance</i> , Quarzmikrowaage
RKM	Rasterkraftmikroskopie
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
rpm	<i>Rotations per minute</i> , Rotationen pro Minute
RU	<i>Response unit</i>
SAM	<i>Self assembled monolayer</i> , selbstorganisierende Einzelschicht
SAP	<i>Shrimp alkaline phosphatase</i> , alkalische Phosphatase aus der Krabbe
scFab	<i>Single chain-fab</i>
scFv	<i>Single chain fragment variable</i> , „Einzelkettenantikörper“
scFv-CH	<i>Single chain fragment variable</i> mit konstanten Domänen der schweren Kette
scFv-dHlx	<i>Single chain fragment variable</i> mit Multimerisierungsdomäne
scFv-Fc	<i>Single chain fragment variable-fragment variable</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
snRNPs	<i>Small nuclear ribonucleoproteins</i> , kleine nukleare Ribonukleine
s	Sekunde
T	Tetracyclin

## Abkürzungsverzeichnis

Tab.	Tabelle
TAE	Tris/Acetat/EDTA
TBS	<i>Tris-buffered saline</i> , Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TCEP	Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin
TEMED	N, N, N',N'-Tetramethyldiamin
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
TY	<i>Trypton yeast broth</i> , Trypton-Hefe-Medium
U	<i>Unit</i> , Einheit
UV	Ultraviolett
V	Volt
VH	Variable Region der schweren Kette
VL	Variable Region der leichten Kette
v/v	<i>Volume to volume</i> , Volumenprozent
w/v	<i>Weight to volume</i> , Gewichtsprozent

**Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1:	Modell eines Antikörpers, eines scFv und eines scFv-Fc-Antikörpers	3
Abb. 2:	Modell eines Antikörper-Phagen	5
Abb. 3:	Konstruktion einer naiven Antikörpergen-Bibliothek und Selektion spezifischer Antikörper ( <i>Panning</i> )	6
Abb. 4:	Schematische Darstellung eines CRP-Moleküls	7
Abb. 5:	Molekülstruktur von Sulfo-GMBS	36
Abb. 6:	Analytische Größenausschlusschromatographie zur Bestimmung der molaren Masse des CRPs	39
Abb. 7:	Titer der eluierten Phagen aus drei Selektionen	40
Abb. 8:	ELISA-Signale von Expressionsüberständen von Einzelklonen der 2. und 3. Selektionsrunde aus der pIT2-Antikörpergen-Bibliothek Tomlinson I und J im indirekten Antigen-ELISA	41
Abb. 9:	Immunfärbung eines Western-Blots nach gelelektrophoretischer Auftrennung CRP-spezifischer scFv in einem 12 %igen SDS-PAA-Gel	44
Abb. 10:	Stabilitätstest unterschiedlich lang gelagerter CRP-spezifischer scFv im indirekten Antigen-ELISA	45
Abb. 11:	Sensorgramme als Overlay-Plot des CRP-spezifischen scFv LA13-IIE3	46
Abb. 12:	Overlay-Plot der Sensorgramme der Epitop-Bestimmung von LA13-IIE3, LA13- IID4 und LA13-IIC3 auf CRP.	48
Abb. 13:	Overlay-Plot der Sensorgramme der Epitop-Bestimmung von LA13-IIE3, LA13- IID4 und LA13-IIC3 auf CRP.	49
Abb. 14:	Overlay-Plot der Sensorgramme der Epitop-Bestimmung von LA13-IIE3, LA13- IID4 und LA13-IIC3 auf CRP.	49
Abb. 15:	Nachweis der CRP-Bindung durch die scFv LA13-IIE3, LA13-IIC3 und LA13-IID4.	50
Abb. 16:	Epitop-Bestimmung CRP-spezifischer scFv auf Peptid- <i>Spots</i> der humanen CRP-Aminosäuresequenz	51
Abb. 17:	Dreidimensionale schematische Darstellung des CRP-Pentamers mit Epitopen von CRP-spezifischen scFv.	52
Abb. 18:	Coomassie-gefärbtes PAA-Gel mit verschiedenen Konzentrationen von BSA und CRP-Peptid-BSA-Konjugaten	53
Abb. 19:	Indirekter Antigen-ELISA mit dem CRP-spezifischen scFv LA13-IID4	54

## Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 20:	Titer der eluierten Phagen aus den drei verwendeten Antikörpergen-Bibliotheken pIT2 Tomlinson I und J, HAL4 und HAL7 nach der Selektion auf CRPeptid-1	55
Abb. 21:	Indirekter Antigen-ELISA mit Expressionsüberständen von Einzelklonen der 2. und 3. Selektionsrunde aus der pHAL7-Antikörpergen-Bibliothek	56
Abb. 22:	Indirekter Antigen-ELISA von CRPeptid-1-spezifischen scFv auf CRPeptid-1, vollständiges CRP-Protein und auf die Negativkontrollen BSA, BSA-GMBS-Linker-Konjugat und BSA-Häm1-Peptid-Konjugat	56
Abb. 23:	Immunoblots mit dem CRP-spezifischen scFv LA13-IIE3 mit und ohne freie Thiol-Gruppe	59
Abb. 24:	Immunoblot mit dem Protein A-aufgereinigten scFv-Fc-Fusionsproteins LA89-IID4	60
Abb. 25:	Vergleich der spezifischen Bindeaktivität verschiedener Antikörperformate nach Absättigung mit unterschiedlichen Blockierungsreagenzien	62
Abb. 26:	Kopplung unterschiedlicher Antikörperfragmente mit verschiedenen Kopplungsreagenzien	62
Abb. 27:	Vergleich funktionaler scFv und Gesamtmenge gebundener scFv	63
Abb. 28:	Rasterkraftmikroskopie-Darstellungen von unbehandelter und mit Protein beladener Quarzresonator-Goldoberfläche	64
Abb. 29:	Spezifische Messung von CRP mittels QCM-Sensor	65
Abb. 30:	Vektorkarte von pHAL14-scFv	95
Abb. 31:	Vektorkarte von pIT2-scFv	95
Abb. 32:	Vektorkarte von pOPE101-XP	96
Abb. 33:	Vektorkarte von pOPE51-XP	96

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes und Temperaturverlauf einer PCR.	23
Tab. 2:	Volumen und Mengen an DNA, Enzymen und Supplementen für einen Restriktionsansatz	23
Tab. 3:	Volumen und Mengen an DNA und Enzymen für einen Ligationsansatz	24
Tab. 4:	Zusammensetzung und Temperaturverlauf eines Sequenzier-PCR-Ansatzes	26
Tab. 5:	Lösungen und Puffer für SDS-PAA-Gele	31
Tab. 6:	Auflistung der aus den Selektionen resultierenden CRP-spezifischen scFv	42
Tab. 7:	Assoziations- und Dissoziationskonstanten CRP-spezifischer scFv	47

## Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Tab. 8:	Kombinationen zwischen verschiedenen CRP-spezifischen scFv und Puffern, die für die Epitop-Bestimmung jener scFv auf dem CM5-Chip koinjiziert wurden	47
Tab. 9:	Für die Antikörperselektion verwendete Antikörpergen-Bibliotheken und Anzahl der in die jeweilige Selektionsrunde eingesetzten Phagen	55
Tab. 10:	Auflistung der aus den Selektionen resultierenden CRPeptid-1-spezifischen scFv LA119-G5 und LA119-H5	57
Tab. 11:	Untersuchung verschiedener Parameter, wie Kopplungsmethode, Antikörperformat und Absättigungsreagenz für die Kopplung von Antikörpern an einer Goldoberfläche	61
Tab. 12:	Sequenzen der Spots auf den CRP-Peptidmembranen	97

## 1. Einleitung

### 1.1 Antikörper und rekombinante Antikörper-Fragmente

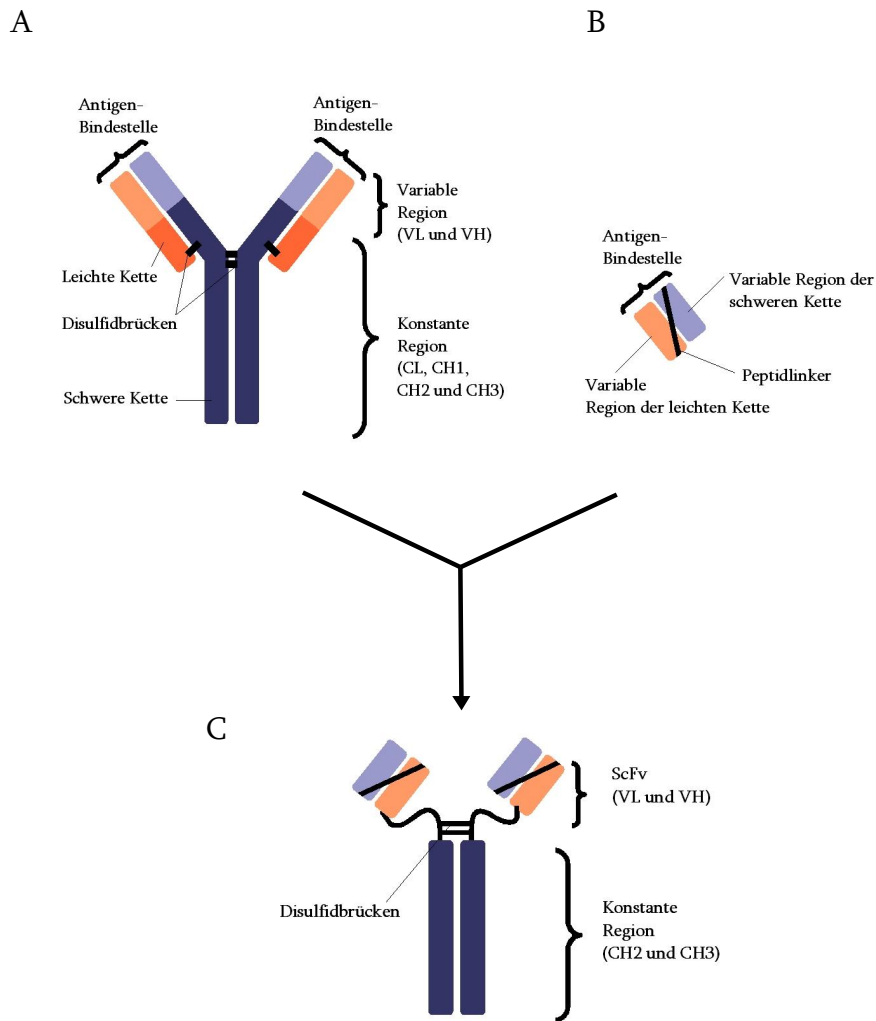
Antikörper wurden Ende des 19. Jahrhunderts von Emil von Behring und Shibasaburo Kitasato im Blutserum entdeckt, für diese bedeutende Entdeckung wurde von Behring 1901 mit dem ersten Nobelpreis für Medizin geehrt. In dem folgenden Jahrhundert gingen viele weitere Nobelpreise an Wissenschaftler aus dem Gebiet der Immunologie und Antikörperforschung, die Relevanz von Antikörpern in der Immunologie wurde zunehmend deutlicher. Gerald M. Edelman und Rodney Robert Porter klärten in den Jahren um 1958 die molekulare Struktur von Antikörpern auf und erhielten dafür 1972 den Nobelpreis für Medizin (Edelman und Gally, 1964). 1984 wurden Georges J. F. Köhler und César Milstein mit dem Nobelpreis für die Entdeckung des Prinzips der Herstellung von monoklonaler Antikörpern mittels Hybridomatechnologie ausgezeichnet (Köhler und Milstein, 1975).

Basierend auf diesen Arbeiten und derer vieler weiterer Wissenschaftler ist heute bekannt, dass Antikörper, die auch als Immunglobuline (Ig) bezeichnet werden, Serumproteine und Teil des adaptiven Immunsystems der *Gnathostomata* sind; ihre Aufgaben liegen in der Opsonisierung von Pathogenen, der Neutralisierung von Toxinen und der Aktivierung des Komplementsystems, einem Teil des angeborenen Immunsystems. Zusätzlich rekrutieren und aktivieren sie weitere Zellen des Immunsystems. Dazu binden sie spezifisch und affin an bestimmte Strukturen. Der Aufbau eines Antikörpers reflektiert direkt seine Funktionen: die variable Region (VL und VH) kann in hoher Vielfalt auftreten und bindet Antigene, die konstante Region kann in einer von fünf bekannten Formen, den Isotypen M, D, G, A und E, vorliegen und übt je nach Isotyp unterschiedliche Effektorfunktionen aus. Die konstante Region ist aus CL, CH1, CH2, CH3, sowie CH4 bei IgM und IgE aufgebaut (Edelman, 1973). Dabei sind IgGs die am häufigsten im humanen Blutserum vorkommenden Immunglobuline (ca. 80 %, 13,5 mg/mL mittlere Serumkonzentration). IgM- und IgA-Moleküle können Multimere bilden, dabei wird zusätzlich ein Polypeptid – die J-Kette – synthetisiert (Janeway, 2002). Die Y-förmigen Antikörpermoleküle besitzen je nach Isotyp und Multimerisierungsgrad eine molekulare Masse zwischen 146 und 970 kDa (Davies und Metzger, 1983) und sind aus zwei identischen schweren und zwei identischen leichten Polypeptidketten aufgebaut (Abb. 1A). Die schweren Ketten sind über zwei Disulfidbrücken

miteinander verbunden, welche bei den meisten Isotypen in der flexiblen *hinge*-Region der schweren Kette lokalisiert sind; jede schwere Kette ist zusätzlich über eine Disulfidbrücke mit einer leichten Kette kovalent assoziiert (Edelman, 1973). In der aminoterminalen variablen Region der leichten und schweren Immunglobulinketten, VL und VH, befinden sich insgesamt sechs Bereiche, die als hypervariable Regionen oder CDRs (*complementarity determining regions*) bezeichnet werden. Diese CDRs bestimmen die Antigenspezifität und werden von jeweils vier Gerüstregionen (FR – *framework regions*) für jede der beiden Ketten flankiert (Wu und Kabat, 1970). Posttranslationale Modifikationen im konstanten Bereich der schweren Kette, insbesondere die N-Glykosylierungen beispielsweise in der CH2-Domäne von IgG1, haben erheblichen Einfluß auf Interaktionen der Antikörper mit dem Immunsystem und treten bei allen Isotypen auf, wobei jeder Isotyp ein charakteristisches Glykosylierungsmuster der konstanten Domäne besitzt (Hust *et al.*, 2007; Chowdhury und Wu, 2005). Die Spezifität von Antikörpern für ein bestimmtes Molekül oder eine bestimmte Struktur macht sie zu einem häufig genutzten Werkzeug für Forscher in Therapie und Diagnostik. In diagnostischen Anwendungen ist vor allem die antigenbindende Region von Antikörpern von Interesse. Durch Spaltung eines IgG-Moleküls mit der Protease Papain entstehen ein Fc-Fragment (*fragment crystallizable*) und zwei Fab-Fragmente (*fragment antigen binding*). Das Fc-Fragment besteht aus den CH2 und CH3-Regionen der schweren Kette, verbunden über die beiden Disulfidbrücken in der *hinge*-Region. Die Fab-Fragmente enthalten die vollständigen leichten Ketten, die über Disulfidbrücken mit den VH und CH1-Domänen der schweren Ketten verbunden sind, und somit den antigenbindenden Bereich (Porter, 1973). Ein weiteres, rekombinant hergestelltes Antikörperfragment ist das monovalente scFv (*single chain fragment variable*), das aus der variablen Region der schweren Kette, die über einen artifiziellen Peptidlinker mit der variablen Region der leichten Kette verbunden ist, besteht (Abb. 1B). (Bird *et al.*, 1988; Huston *et al.*, 1988). Für diagnostische Anwendungen liegt der Vorteil dieses Antikörperformats im Vergleich zu vollständigen Immunglobulinen in der kostengünstigen und zeitsparenden Produktion in *E. coli*. Für therapeutische Einsätze werden nach wie vor hauptsächlich IgGs verwendet, welche noch zusätzlich Effektorfunktionen vermitteln können (Schirrmann *et al.*, 2008). ScFv-Fc-Fusionsproteine (Abb. 1C) besitzen eine höhere Stabilität und apparente Affinität als scFv. Diese bestehen aus dem Fc-Teil eines Immunglobulins und zwei scFv, die über flexible Peptidlinker mit dem Fc-Teil verbunden sind, sodass scFv-Fc-Fusionsproteine wie IgGs bivalent sind. Vektoren für die Expression von scFv-Fc-Fusionsproteinen sind für



verschiedene Organismen, wie z. B. Hefen und Säugerzellen, beschrieben und ermöglichen eine Subklonierung in einem Schritt über das C-terminale Ende der leichten Kette von monovalenten scFv in ein bivalentes Antikörperformat (Powers *et al.*, 2001; Ronnmark *et al.*, 2002; Van Droogenbroeck *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2007; Kato *et al.*, 1995)



**Abb. 1: Modell eines Antikörpers, eines scFv und eines scFv-Fc-Antikörpers.** A: Immunglobuline bestehen aus zwei identischen schweren Ketten (blau), die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind, sowie zwei identischen leichten Ketten (orange), die mit je einer schweren Kette kovalent assoziiert sind. Die variablen Regionen sind heller als die konstanten Regionen dargestellt. B: Ein scFv besteht aus der VL und der VH, die mit einem Peptidlinker miteinander verbunden sind. C: ScFv-Fc-Antikörper besitzen den Fc-Teil eines Immunglobulins (dunkelblau) und eine *hinge*-Region, über welche insgesamt zwei scFv gebunden sind. Das Molekül ist bivalent, kann durch den Fc-Teil Effektorfunktionen vermitteln und lässt sich mit einem Schritt ausgehend von einer scFv-Genkassette subklonieren.

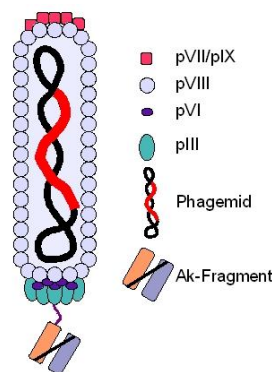
Weitere Antikörperfragmente wie *single-chain* Fabs (scFabs), Diabodies, scFv-CHs, scFv-dHlx und andere wurden bereits für zahlreiche diagnostische Anwendungen konstruiert und produziert (Schirrmann et al., 2008).

### 1.2 Phagen Display

Viren, deren Wirtsspektrum Bakterien umfasst, werden als Bakteriophagen (kurz: Phagen) bezeichnet. Peptide oder Proteine können mittels Phagen Display auf der Oberfläche von Bakteriophagen präsentiert werden (Smith, 1985; Winter, 1994; Willats, 2002). Hierbei werden Phagenoberflächenproteine als Fusionsproteine mit einem heterologen Peptid oder Protein in die Phagenhülle integriert und so auf der Phagenhülle präsentiert. Das Phagenhüllprotein und das heterogene Protein bleiben dabei funktionsfähig (Barbas *et al.*, 1991). Die Hülle des Phagen (z.B. der filamentöse Phage M13) ist aus ca. 2700 Kopien des Gen VIII Proteins, welches die Hauptstruktur bildet, aufgebaut, weitere Proteine sind an dem Aufbau der filamentösen Phagenhüllstruktur beteiligt. Fünf bis acht Kopien des Gen III Proteins befinden sich am oberen Ende des Phagen, das Gen III Protein wird beim Phagen Display üblicherweise als Fusionsprotein mit dem heterogenen Protein exprimiert. Die Fusionsproteine sind auf Phagemiden, welche Replikationsursprünge für die Propagation des Vektors in *E. coli*, Resistenzgene, sowie die codierende Sequenz für das Fusionsprotein unter der Kontrolle eines Promotors für die Expression in *E. coli* besitzen, kodiert. Bei der Assemblierung von Phagenpartikeln innerhalb ihres bakteriellen Wirtes werden diese Phagemide anstelle des Phagen-genoms in die Phagen verpackt. Anfang der 1990er Jahre wurde erstmals das Phagendisplay mit Antikörperfragmenten gezeigt (McCafferty *et al.*, 1990; Clackson *et al.*, 1991; Barbas *et al.*, 1991)(Abb. 2). Dabei ist das präsentierte scFv-pIII-Fusionsprotein direkt mit der kodierenden Gensequenz gekoppelt (Barbas *et al.*, 2001; Sambrook und Russell, 2001; O'Brien und Aitken, 2002).

Antikörpergen-Bibliotheken mit einem Umfang von  $10^7$  -  $10^{10}$  verschiedenen Antikörpergenen, isoliert aus humanen Lymphozyten, können in Phagen verpackt und auf ihrer Oberfläche exprimiert werden (Breitling und Dübel, 1997). Bei Antikörpergen-Bibliotheken unterscheidet man zwischen Immunbibliotheken und den universellen *single-pot* Bibliotheken, zu denen die naiven, die semi-synthetischen und die synthetischen Bibliotheken gehören. Für die Generierung von Immunbibliotheken werden die V-Gene IgG-sekretierender Plasmazellen von immunisierten

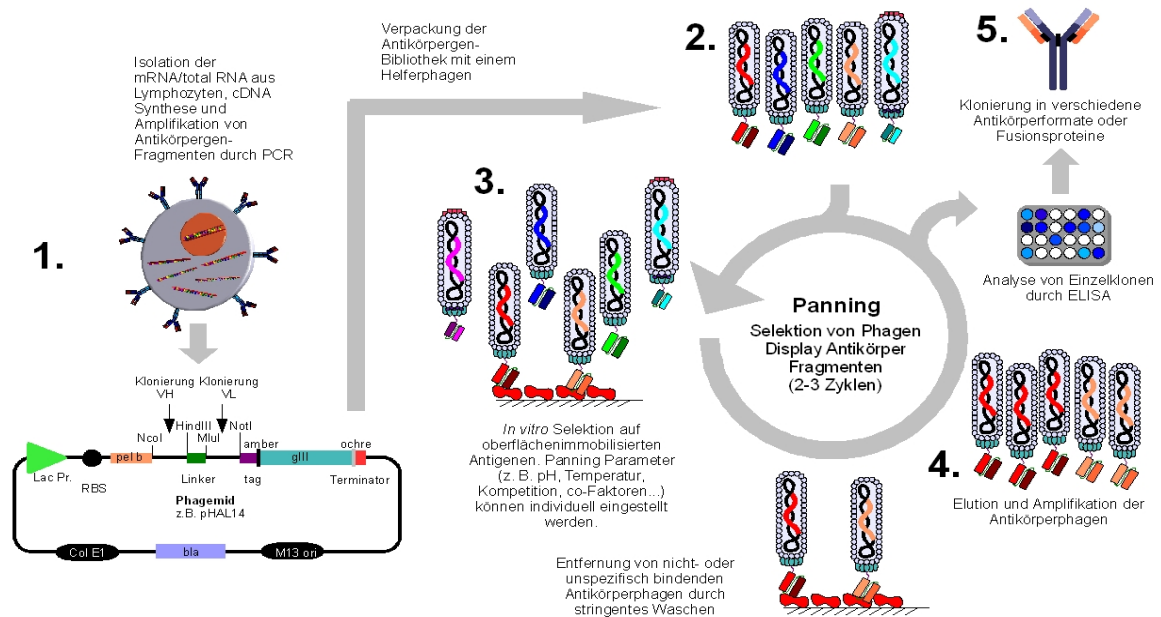
Spendern amplifiziert (Clackson *et al.*, 1991).



**Abb. 2: Modell eines Antikörper-Phagen.** Für das Phagen Display von scFv wird der filamentöse Phage M13 verwendet. Das scFv-Gen ist auf dem Phagemid kodiert und wird als Fusion mit dem Phagenhüllprotein pIII exprimiert. Weitere Phagenhüllproteine sind an dem Aufbau des Phagen beteiligt und schließen bei der Assemblierung des Phagen das Phagemid, welches Replikationsursprünge für die Amplifikation des Phagen in *E. coli* enthält, mit ein, sodass der Phänotyp und Genotyp miteinander gekoppelt sind.

Isolierte Antikörper aus Immunbibliotheken, die gegen das Antigen gerichtet sind, mit dem der Organismus immunisiert wurde, können monovalente Dissoziationskonstanten im nanomolaren Bereich besitzen. Aus *single-pot*-Bibliotheken hingegen lassen sich Antikörper mit nahezu jeder erdenklichen Spezifität isolieren (Marks *et al.*, 1991; Griffiths *et al.*, 1993), wobei sich die Affinität der Antikörper im Bereich von Mikromol bis Nanomol befindet, je nach Diversität und Größe der Bibliothek (Hoogenboom 1997). Naive *single-pot*-Bibliotheken werden aus den V-Genen von B-Zellen (IgM) nichtimmunisierter Spender konstruiert (Hust *et al.*, 2007). Im Gegensatz dazu werden für die Konstruktion von semi-synthetischen *single-pot*-Bibliotheken einzelne Aminosäuren in den CDR3-Bereichen randomisiert (Pini *et al.*, 1998; Goletz *et al.*, 2002). Vollsynthetische *single-pot*-Bibliotheken besitzen eine künstliche Gerüstregion, in welche randomisiert CDR-Kassetten integriert sind (Hayashi *et al.*, 1994; Knappik *et al.*, 2000). Ausgehend von diesen Bibliotheken können einzelne Antikörper mit einer Spezifität für ein bestimmtes Protein, Hapten oder Molekül isoliert werden. Diese Selektion wird als *Panning* bezeichnet (Abb. 3) (Parmley und Smith, 1988). In diesem Prozess werden die Antikörper-Phagen einer Antikörpergen-Bibliothek auf immobilisiertem Antigen inkubiert. Antigene können auf Polystyrol, magnetischen Beads oder anderen Oberflächen adsorptiv oder chemisch immobilisiert

werden (Wilkinson *et al.*, 2000; Barbas *et al.*, 2001; Hust *et al.*, 2002). Unspezifische Bindung der Antikörper-Phagen an freie Oberflächen wird durch Inkubation mit BSA/Milchpulver oder anderen Absättigungsreagenzien blockiert. Konkurrenz, Präadsorption und weitere Parameter können zusätzlich eingestellt werden. Nach der Inkubation werden nichtbindende Phagen gewaschen und gebundene Phagen eluiert. Mit diesen werden F' *E. coli*-Zellen über ihren F-Pilus infiziert, die Amplifikation der Phagenpartikel erfolgt in den *E. coli*-Zellen mithilfe von Helferphagen, welche die genetische Information für die restlichen Phagenhüllproteine tragen. Dabei wird der M13K07 Helferphage für die Generierung monovalent präsentierender Phagen verwendet (Vieira und Messing, 1987), *Hyperphage* dagegen wird für oligovalentes Display (Rondot *et al.*, 2001) eingesetzt. Letzterer trägt eine Deletion in dem gIII-Gen, d. h. er kann keine funktionellen Gen III Proteine mehr in *E. coli* produzieren lassen, welche mit dem pIII::scFv-Fusionsprotein aus dem Phagemid kompetieren. Die amplifizierten Antikörper-Phagen können in weitere 2-3 Selektionsrunden eingesetzt werden.

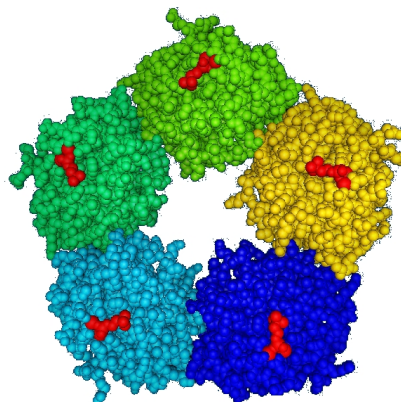


**Abb. 3: Konstruktion einer naiven Antikörpergen-Bibliothek und Selektion spezifischer Antikörper (Panning).** Für die Konstruktion einer naiven Phagen Display Antikörpergen-Bibliothek werden VH und VL aus Lymphozyten isoliert und in einen Phagemid-Vektor subkloniert (1.). Die Phagemide werden mittels Helferphagen in M13-Phagen verpackt (2.) und können in eine Selektion von spezifischen Antikörper-Phagen (*Panning*; 3.) eingesetzt werden. Spezifisch bindende Phagen werden eluiert und durch Infektion von *E. coli*-Zellen amplifiziert (4.). Darauf erfolgt entweder der Einsatz der amplifizierten Antikörper-Phagen in eine neue Selektionsrunde (2.) oder eine Analyse von Einzelklonen und fakultativ das Umsetzen der Antikörper-Genkassetten für die Produktion verschiedener Antikörperformate (5.).

### 1.3 C-reaktives Protein (CRP)

Das C-reaktive Protein ist ein Akute-Phase-Protein und wurde 1930 am Rockefeller Institut für Medizinische Forschung entdeckt: das Serum von Patienten mit einer pneumokokkalen Lungenentzündung präzipitierte bei Inkubation mit der löslichen polysaccharidhaltigen Fraktion C von *Pneumococcus pneumoniae* (Tillet und Francis, 1930). Später wurde als reaktive Substanz im Serum für diese Präzipitation das C-reaktive Protein gefunden (McCarty, 1982).

Das C-reaktive Protein ist ein Protein aus der Familie der Pentraxine. Es ist ein phylogenetisch hoch konserviertes Plasmaprotein mit Homologen bei Vertebraten und Invertebraten. CRP ist ein Homopentamer aus fünf identischen, nichtkovalent assoziierten Monomeren, die symmetrisch um eine zentrale Pore angeordnet sind, wobei jedes Protomer eine relative Molekülmasse von 23 kDa besitzt (Black *et al.*, 2004). Jede Untereinheit kann zwei Calcium-Ionen binden, mit denen eine calciumabhängige spezifische Bindung eines Liganden möglich ist (Abb. 4).



**Abb. 4: Schematische Darstellung eines CRP-Moleküls.** Jedes Monomer des C-reaktiven Proteins besteht aus 2 antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern, die nichtkovalent miteinander verbunden sind. Dabei kann jede Untereinheit 2 Calcium-Ionen (rot) binden, welche die Ligandenbindung vermitteln. Auf der gegenüberliegenden Seite befindet sich eine Tasche, in der sich die Bindestelle für den Komplementfaktor C1q, sowie auch für Fc-Rezeptoren, befindet.

Die höchste Avidität zu CRP besitzt dabei Phosphocholin, ein Bestandteil der Phospholipide der Zellwand von Bakterien, ebenso ist Phosphocholin am Zellwandaufbau humaner Plasmalipoproteine beteiligt (Thompson *et al.*, 1999). Mit der Bindung des ersten gebundenen Liganden kommt es zu einer Konformationsänderung im CRP-Makromolekül, welche zu einer erhöhten Affinität zu den konsekutiven Liganden führt. CRP ist also ein allosterisches Protein und bindet neben Phosphocholin Histone, Chromatin und kleine nukleare Ribonukleoproteine (snRNPs), d. h. es hat weitere Funktionen im Abbau von Zellkernbestandteilen (Du Clos *et al.*,

1988; Du Clos, 1989).

CRP aktiviert bei Komplexierung mit Phosphocholin die Komplementkaskade über Erkennung durch C1q und führt so als Teil der angeborenen Abwehr zur Opsonisierung und Phagozytose Phosphocholin-enthaltender Mikroorganismen (Agrawal *et al.*, 2001; Wolbink *et al.*, 1996). Parallel dazu wird Material nekrotischer Körperzellen erkannt und abgebaut (Gershov *et al.*, 2000). Neben der Aktivierung des Komplementsystems kann CRP die Fc-Rezeptoren für IgG Moleküle, FcγRI und FcγRIIa binden, was zu der Opsonophagozytose von Mikroorganismen oder abgestorbenen Körperzellen führt (Gewurz *et al.*, 1995). Weiterhin wurden anti-inflammatorische Effekte, wie die Induktion der Expression von IL-1 Rezeptoren, die Ausschüttung von IL-10 und die Hemmung der Interferon-γ Synthese beschrieben (Tilg *et al.*, 1993; Mold *et al.*, 2002; Szalai *et al.*, 2002). Gleichzeitig führt CRP aber auch zu pro-inflammatorischen Effekten, wie z. B. die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen, die Stimulation von IL-8, der Anstieg von IL-1, IL-6, IL-18 und TNF-α (Ballou und Lozanski, 1992; Venugopal *et al.*, 2002).

CRP wird hauptsächlich von Hepatocyten gebildet und verbleibt ohne inflammatorischen Stimulus an zwei Carboxylesterasen gebunden im endoplasmatischen Retikulum (Macintyre *et al.*, 1994), sodass es nach einem inflammatorischen Stimulus schnell und effektiv in großer Zahl aus der Zelle in das Blutplasma gelangen kann. Eine vermehrte CRP-Produktion wird durch Cytokine induziert, wobei die Bindung des Transkriptionsfaktors c/EBPβ durch diese heraufreguliert wird und an den CRP-Promotor bindet (Agrawal *et al.*, 2003). Gleichzeitig nimmt die Bindungsaffinität der Carboxylesterasen ab und das CRP wird aus dem endoplasmatischen Retikulum und im Anschluß aus der Zelle geschleust (Yue *et al.*, 1996).

In der klinischen Diagnostik von Entzündungsmarkern werden neben Körpertemperatur, Leukozytenzahl und Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit (BSG) die Proteine der Akuten-Phase, einer Entzündungsreaktion im Körper, bestimmt. Fieber, BSG und Leukozytenzahl-Bestimmung kann von der körperlichen Konstitution oder anderen Erkrankungen beeinflusst sein und zu falsch positiven oder negativen Befunden hinsichtlich einer Infektion führen, was bei der Bestimmung von Akute-Phase Proteinen nicht der Fall ist (Höffler und Shah, 1997; Thomas, 1998; Kushner, 2001). Bei bakteriellen Infektionen steigt das CRP unter den Akute-Phase-Proteinen mit dem bis zu 1000fachen des Normalwertes am stärksten an (Husebekk und Hansson, 2000; Kushner, 2001). Der Anstieg erfolgt sehr schnell nach Entzündungsstimulus, seine kurze

Halbwertszeit von weniger als 19 h bei Bindung an einen Liganden macht ihn damit zusätzlich zu einem bedeutenden und signifikanten Entzündungsparameter (Dörner, 1999; Höffler und Shah, 1997). Neben der hohen Zuverlässigkeit lässt die CRP-Bestimmung zusätzlich eine Differenzierung zwischen viralen und bakteriellen Erkrankungen zu, da es spezifisch für bakterielle Inflammationen ist (Schofield *et al.*, 1982; Tejani *et al.*, 1995). Die CRP-Konzentration im Blutserum wird als inflammatorischer Marker herangezogen, allerdings gilt CRP auch als unabhängiger Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen und weitere Zivilisationskrankheiten, sodass die Generierung und Charakterisierung CRP-spezifischer Antikörper für prophylaktische Schnelltests von großem Interesse ist. (Clearfield *et al.*, 2005).

### 1.4 Lab-on-chips

Lab-on-chips sind mikrofluidische Systeme, die die gesamte Funktionalität eines großen Labors auf wenige Zentimeter große Kunststoffsubstrate unterbringen. Innerhalb dieser Systeme können umfangreiche biologische, chemische oder physikalische Prozesse stattfinden. Angewendet werden Mikroanalysesysteme beispielsweise für *Real-Time*-PCR, biochemische Assays, antikörperbasierte Immunoassays, Blutprobenvorbereitungen, Dielektrophorese für die Sortierung und Detektion von Nanopartikeln, Viren oder Zellen und Einzelzellanalysen (Yager *et al.*, 2006; El-Ali *et al.*, 2006). Einige physikalische und chemische Effekte werden durch Miniaturisierung verstärkt oder erst induziert, wie z. B. Kapillarkräfte, Oberflächenrauhheit oder chemische Wechselwirkungen mit dem Material, aus dem das Analysesystem gefertigt wurde. Es können dabei höhere Hintergrundsignale als in herkömmlichen Testsystemen auftreten und die handwerkliche Herstellung miniaturisierter Systeme ist häufig noch nicht ausreichend präzisiert, wie es bei den größeren Systemen der Fall ist. Vorteile dieser miniaturisierten Analysesysteme dagegen sind die geringen Probenvolumina, schnelle Analysen durch kürzere Diffusionszeiten der Analyten, bessere Kontrolle des Prozesses durch schnelle Testantworten, Kompaktheit des Systems und dadurch die Möglichkeit, mehrere Tests parallel ablaufen lassen zu können, sowie geringere Herstellungskosten der Analysesysteme (Yager *et al.*, 2006)

Neben der Verwendung von Glas oder Plastik wird häufig Polydimethylsiloxan (PDMS) für die Herstellung von Mikrochips verwendet. Es eignet sich gut durch seine ausgezeichnete Biokompatibilität, gute Handhabbarkeit und geringe Kosten. Es ist außerdem transparent für

sichtbare Wellenlängen, gasdurchlässig und weist dauerhafte mechanische Eigenschaften auf (Nguyen, 2004). Durch eine Behandlung in einem Sauerstoffplasma lassen sich die Oberflächeneigenschaften so verändern, dass es mit Glas-, Quarz- oder weiteren PDMS-Strukturen verbunden werden kann. Die Herstellung mikrofluidischer Systeme erfolgt meist softlithographisch (Xia und Whitesides, 1998). Dabei muss nur einmal eine Negativform erzeugt werden, die mit Hilfe eines UV-sensitiven Photolacks hergestellt wird. Anschließend kann die Positivform aus PDMS nahezu beliebig oft abgeformt werden.

Als massensensitiver Messfühler in einem Mikroanalysesystem kann eine Quarzkristallmikrowaage (QCM) eingesetzt werden (Janshoff *et al.*, 2000, Kurosawa *et al.*, 2003; Liefekett 2003; Michalzik *et al.*, 2005b). Anfang des letzten Jahrhunderts wurden erstmals durch Spannung schwingende Siliziumquarze genauer untersucht und als Verstärker und Sender eingesetzt (Neubig und Briese, 1997). Mittlerweile wurden Quarzoszillatoren in zahlreichen Bereichen eingesetzt und haben sich als Schaltungseinheit vielfach bewährt. Für den Einsatz von QCM in Mikroanalysesystemen werden Quarze auf eine bestimmte Dicke geätzt, sodass sie bei einer Resonanzfrequenz  $f_0$  von beispielsweise 20 MHz schwingen. Da die Resonanzfrequenz von der Dicke des Quarzes abhängig ist, können Massenveränderungen auf dem Quarz als Frequenzveränderungen gemessen werden. Für die Anwendung als Immunosensor wird eine Oszillatorspannung angelegt, das Messsignal ist die resultierende Frequenzverschiebung, die sich aus der Massenlagerung auf der Quarzoberfläche ergibt (Liefekett *et al.*, 2003). Durch die Immobilisierung von spezifischen Fängermolekülen, wie z. B. Antikörpern, an den Quarzresonator ist die selektive Detektion einzelner Analyte aus einer Lösung möglich. Dies kann ein Blutparameter, wie das CRP sein, womit eine schnelle Bestimmung für beispielsweise postoperative Kontrollen außerhalb von Kliniken und Laboratorien ermöglicht werden könnte (Esposito *et al.*, 2005). Diese werden sonst in Einzeltest wie ELISA durchgeführt (Dominici *et al.*, 2004), wofür qualifiziertes Personal und ein hoher Zeitaufwand benötigt werden (Correia *et al.*, 2003). Nicht nur der Zeitaufwand, auch der Probenaufwand kann durch QCM-basierte Mikroanalysesysteme für CRP von einem Volumen von 100  $\mu$ l auf ein Volumen von 1  $\mu$ l reduziert werden, und der Test kann in einem Zeitraum von 10 min durchgeführt werden.



## 1.5 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung eines integrierbaren mikrofluidischen Analysesystems zur spezifischen Diagnostik des Entzündungsmarkers CRP aus dem Blutserum. Die Entwicklung eines derartigen Systems soll den anwendungsbezogenen Abschluß des Sonderforschungsbereiches 578 „Integration gen- und verfahrenstechnischer Methoden zur Entwicklung biotechnologischer Prozesse: Vom Gen zum Produkt“, in dem dieses Projekt eingefaßt ist, bilden.

Dazu werden in dieser Arbeit Antikörper als Fängermoleküle für CRP aus humanen Antikörpergen-Bibliotheken mittels Phagen-Display-Technologie isoliert. Es soll außerdem ein Vergleich zwischen Antikörpern, die gegen natives Protein selektiert werden, mit Antikörpern, die gegen CRP-Peptide isoliert werden, folgen. Die isolierten CRP-spezifischen Antikörper sollen dann hinsichtlich Antigenbindestelle, Affinität und Stabilität charakterisiert und ihre Stabilität gegebenenfalls optimiert werden. In einem weiterführenden Schritt sollen Optimierungen der Antikörperkopplung an eine mikrofluidische Quarzmikrowaage hinsichtlich Kopplungsverfahren und Antikörperformat erfolgen. Diese bestimmen später die Handhabung des Testsystems im medizinischen Arbeitsumfeld. Die Validierung des Fließsystem soll abschließend durch Messungen mit CRP-Lösungen erfolgen, um damit die endgültige Voraussetzung für die Entwicklung eines regenerierbaren Lab-on-chip für die *point of care* Diagnostik von CRP zu schaffen.

## 2.1 Material

### 2.1.1 Antikörpergen-Bibliotheken

Name	Beschreibung
pIT2	Phagen-Display-Vektor für die Präsentation von scFv als scFv-pIII-Fusionsprotein auf M13-Phagen und die Expression unfusionierter scFv; semisynthetische Antikörpergen-Bibliothek Tomlinson I und J
pHAL14	Phagen-Display-Vektor für die Präsentation von scFv als scFv-pIII-Fusionsprotein auf M13-Phagen und die Expression unfusionierter scFv; naive Antikörpergen-Bibliothek HAL4 und HAL7

### 2.1.2 Bakterienstämme, Bakteriophagen und Zelllinien

Name	Beschreibung/Genotyp
<i>E. coli</i> XL-1 Blue MRF'	(Stratagene, Heidelberg) K12-Stamm zur Expression von scFv und Infektion durch M13-Phagen; $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac$ [F' proAB lacI <sup>q</sup> Z $\Delta$ M15 Tn10 (Tet <sup>r</sup> )]
Hyperphage	Helferphage zur polyvalenten Präsentation von scFv (Rondot <i>et al.</i> , 2001)
M13K07	Helferphage zur monovalenten Präsentation von scFv (Vieira und Messing, 1987)
HEK293T	Humane embryonale Nierenzelllinie, ATCC-Nr. CRL-11268

### 2.1.3 Plasmide

Name	Beschreibung
pOPE101-XP (LA25-4)	Expressionsvektor für die prokaryotische Produktion von scFv; enthält myc-Tag und His-Tag
pOPE51-XP (LA79-1)	Expressionsvektor für die prokaryotische Produktion von scFv; enthält myc-Tag und His-Tag sowie ein C-terminales Cystein für die Ausbildung von intermolekularen Disulfidbrücken
pCMV-hIgG1-Fc-XP (TS59.3)	Expressionsvektor für die eukaryotische Expression von scFv-Fc-Fusionsproteinen

### 2.1.4 Oligonukleotide

Name	Sequenz	Beschreibung
MHgIII_r1	5'-cta aag ttt tgt cgt ctt tcc-3'	Amplifikation oder Sequenzierung von scFv-Genen aus dem Vektor pIT2 oder pHAL14
MHLacZPro_f	5'-ggc tcg tat gtt gtg tgg-3'	Amplifikation oder Sequenzierung von scFv-Genen aus dem Vektor pIT2 oder pHAL14
MHpOPE_f2	5'-ctt aga ttc aat tgt gag cgg-3'	Amplifikation oder Sequenzierung von scFv-Genen aus dem Vektor pOPE101 oder pOPE51
MHpOPE_r2	5'-ctg atc att agc aca ggc c-3'	Amplifikation oder Sequenzierung von scFv-Genen aus dem Vektor pOPE101 oder pOPE51
pCMV-hIgG1-Fc_f	5'-cgc aaa tgg gcg gta ggc-3'	Amplifikation oder Sequenzierung von scFv-Genen aus dem Vektor pCMV-hIgG1-Fc-XP
pCMV-hIgG1-Fc_r	5'-cca gga gtt cag gtg ctg-3'	Amplifikation oder Sequenzierung von scFv-Genen aus dem Vektor pCMV-hIgG1-Fc-XP

### 2.1.5 Enzyme

T4-DNA-Ligase	Promega, Mannheim
SAP ( <i>shrimp alkaline phosphatase</i> , Alkalische Phosphatase aus der Krabbe)	NEB, Frankfurt am Main
Restriktionsendonukleasen	NEB, Frankfurt am Main
RedTaq-Polymerase	Sigma, München
Trypsin	Sigma, München

### 2.1.6 Antikörper

Human $\alpha$ -Mucin1 (IIB6)	scFv/scFv-Fc-Fusionsprotein, AG Dübel, TU Braunschweig
Maus $\alpha$ -Lysozym (D1.3)	scFv/scFv-Fc-Fusionsprotein, AG Dübel, TU Braunschweig
Maus $\alpha$ -(c)myc-Tag (9E10)	IgG, AG Dübel, TU Braunschweig
Protein N	Polyklonale Antikörper, Dade Behring, Eschborn

Maus $\alpha$ -CRP (4C28, C6)	Monoklonaler IgG, Diasys, Holzheim
Ziege $\alpha$ -Maus IgG-Fc, AP-konjugiert	Polyklonale Antikörper, Sigma, München
Ziege $\alpha$ -Maus IgG-Fc, HRP-konjugiert	Polyklonale Antikörper, Sigma, München
Ziege $\alpha$ -Human IgG-Fc	Polyklonale Antikörper, Sigma, München
Ziege $\alpha$ -Human IgG- $\gamma$ -Kette, HRP-konjugiert	Polyklonale Antikörper, Sigma, München

### 2.1.7 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien und Biochemikalien entsprachen dem analytischen Reinheitsgrad. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Chemikalien von folgenden Firmen bezogen: Fluka/Sigma-Aldrich (Neu-Ulm), MBI Fermentas (St. Leon Roth), Merck KGaA (Darmstadt), Riedel-de Haën AG (Sarstedt), Roche (Mannheim), BD (Sparks, USA), Carl Roth (Karlsruhe), AppliChem GmbH (Darmstadt), Pierce Perbio Science (Bonn) und Serva (Heidelberg)

### 2.1.8 Puffer und Lösungen

TFB1	10 mM $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ , 30 mM $\text{CH}_3\text{COOK}$ , 50 mM $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$ oder $\text{MnCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ , 100 mM $\text{RbCl}$ , 15 % (v/v) Glycerin, pH 5,8 mit $\text{CH}_3\text{COOH}$
TFB2	10 mM Morpholinopropansulfonsäure, 10 mM $\text{RbCl}$ , 75 mM $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ , 15 % (v/v) Glycerin, pH 8,0 mit $\text{KOH/CH}_3\text{COOH}$
Suspendierungspuffer für Plasmidpräparation	50 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA pH 8,0, 100 $\mu\text{g/mL}$ Rnase A
Lysispuffer für Plasmidpräparation	0,2 M NaOH, 1 % (w/v) SDS
Neutralisierungspuffer für Plasmidpräparation	3 M Kaliumacetat, pH 5,5
Ethidiumbromid-Stammlösung	10 mg/mL Ethidiumbromid in $\text{H}_2\text{O}$
TAE Puffer	40 mM Tris, 20 mM $\text{CH}_3\text{COOH}$ , 2 mM EDTA
PBS	8,5 g/L NaCl, 1,34 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ , 0,35 g/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4$
PBST	0,05 % (v/v) Tween20 in PBS
2 % (w/v) MPBST	2 % (w/v) Milchpulver in PBST
PE-Puffer	50 mM Tris/HCl pH 8, 20 % (w/v) Saccharose

Natriumcarbonatpuffer	50 mM NaHCO <sub>3</sub> , pH 9,6
TMB Substratlösung für ELISA	Lösung A: 30 mM Kaliumcitrat, 10 % (w/v) Zitronensäure, pH 4,1. Lösung B: 10 mM Tetramethylbenzidin + 10 % (v/v) Aceton + 90 % (v/v) Ethanol + 80 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30 %) 20 Teile A mit 1 Teil B mischen
Acrylamid-Mix	30 % (w/v) Acrylamid, 0,8 % (w/v) Bisacrylamid
Laemmli-Puffer	50 % (v/v) Glycerin, 15 % (v/v) β-Mercaptoethanol, 3,6 % (w/v) SDS, 0,02 % (w/v) Bromphenolblau
Laufpuffer für SDS-PAGE	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS
Transferpuffer für Western Blot	25 mM Tris, 192 mM Glycin
Substratpuffer für Western Blot	100 mM Tris/HCl, pH 9,5, 0,5 mM MgCl <sub>2</sub>
NBT-Lösung für Western Blot	30 mg NBT/mL in 70 % (v/v) DMF
BCIP-Lösung für Western Blot	15 mg BCIP/mL in DMF
Substratlösung für Western Blot	100 µL NBT-Lösung und 100 µL BCIP-Lösung in 10 mL Western Blot-Substratpuffer
Fixierlösung für Silberfärbung	50 mL Stopplösung, 0,0185 % (v/v) Formaldehyd
Natriumthiosulfatlösung für Silberfärbung	0,02 % (w/v) Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> x 5 H <sub>2</sub> O
Silberlösung für Silberfärbung	0,2 % (w/v) AgNO <sub>3</sub> , 0,028 % (v/v) Formaldehyd
Entwickler für Silberfärbung	6 % (w/v) Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , 0,0185 % (v/v) Formaldehyd, 0,002 % (w/v) Natriumthiosulfatlösung
Stopplösung für Silberfärbung	50 % (v/v) Methanol, 12 % (v/v) Eisessig
Bindepuffer für Protein A-Säule	20 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O, mit 20 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O pH 7 einstellen
Waschpuffer für Protein A-Säule	0,1 M Zitronensäure, mit 0,1 M Tri-Natriumcitrat pH 5 einstellen
Elutionspuffer für Protein A-Säule	0,1 M Zitronensäure, mit 0,1 M Tri-Natriumcitrat pH 2,5 einstellen
Neutralisierungspuffer für Protein A-Säule	2 M Tris/HCl, pH 9
Bindepuffer für His-Tag Aufreinigung	20 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,5 M NaCl, 10 mM Imidazol
TBS	150 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 7,4
TBST	0,05 % (v/v) Tween20 in TBS
BCIP-Lösung für Epitop-Bestimmung	60 mg BCIP/mL DMF
MTT-Lösung	50 mg MTT/mL in 70 % (v/v) DMF

CBS	138 mM NaCl, 2,67 mM KCl, 10 mM Citronensäure, pH 7 mit NaOH einstellen
Färbelösung für Epitop-Bestimmung	10 ml CBS, 50 µl 1 M MgCl <sub>2</sub> , 40 µl BCIP, 60 µl MTT
Puffer A für Epitop-Bestimmung	8 M Harnstoff, 1 % (w/v) SDS, 0,5 % (v/v) β-Mercaptoethanol, pH 7 mit Essigsäure einstellen
Puffer B für Epitop-Bestimmung	Essigsäure/EtOH/H <sub>2</sub> O (1:5:4)
Konjugationspuffer für Peptidkopplung	0,083 M Natriumphosphat, 0,9 M NaCl, 10 mM EDTA, pH 7,2

### 2.1.9 Nährmedien und Supplemente

2 x TY Medium	1,6 % (w/v) Trypton 1 % (w/v) Hefe-Extrakt 0,5 % (w/v) NaCl
2 x TY-Agar	1,5 % (w/v) Agar-Agar in 2 x TY-Medium
2 x TY-GA-Medium	100 mM Glukose, 100 µg/mL Ampicillin in 2 x TY-Medium
2 x TY-AK-Medium	100 µg/mL Ampicillin, 50 µg/mL Kanamycin in 2 x TY-Medium
2 x TY-T-Medium	50 µg/mL Tetracyclin in 2 x TY-Medium
SOC Medium	2 % (w/v) Trypton 0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt 0,05 % (w/v) NaCl 20 mM Magnesiumlösung, 20 mM Glukose, pH 7
Magnesiumlösung	1 M MgCl <sub>2</sub> , 1 M MgSO <sub>4</sub>
Ampicillin	100 mg/mL Ampicillin
Tetracyclin	5 mg/ml Tetracyclin in Ethanol
Kanamycin	10 mg/mL Kanamycin
DMEM High Glucose Medium	PAA Lab GmbH, Parsing, Österreich
Trypsin/EDTA	PAA Lab GmbH, Parsing, Österreich
Penicillin/Streptomycin	PAA Lab GmbH, Parsing, Österreich
FCS	PAA Lab GmbH, Parsing, Österreich
FCS low IgG	PAA Lab GmbH, Parsing, Österreich

**2.1.10 Kit-Systeme**

Qiagen Plasmid Midi Kit (100)	Qiagen, Hildesheim
GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit	GE Healthcare, München
Big Dye Terminator Sequencing Kit	P.E. Applied Biosystems, Waltham, USA
Gel Filtration HMW Calibration Kit	GE Healthcare, München
HEKfectin	BioRad, München

**2.1.11 Verbrauchsmaterialien**

Reaktionsgefäße, 1,5 mL und 2 mL	Sarstedt, Nümbrecht
Mikro-Schraubröhrchen, 2 mL	Sarstedt, Nümbrecht
PCR-Reaktionsgefäße	Greiner bio-one, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen, 15 mL und 50 mL	Greiner bio-one, Frickenhausen
Mikrotiterplatten, Polypropylen	Greiner bio-one, Frickenhausen
Mikrotiterplatten, Polystyrol	Maxisorp, Nunc, Wiesbaden Falcon, BD, Heidelberg
Immunostripes, Polystyrol	Maxisorp, Nunc, Wiesbaden
Petrischalen, 10 cm und 15 cm Durchmesser	Greiner bio-one, Frickenhausen
Dialysierschlauch	Ausschlussgrenze: 14 000 Da; Carl Roth, Karlsruhe
PVDF Membran	Carl Roth, Karlsruhe
Filterpapier	GB 002, Schleicher & Schüll, Dassel
Zellkulturschalen	Sarstedt, Nümbrecht
6- <i>well</i> Flachbodenplatten	Cellstar, Greiner bio-one, Frickenhausen
CM5 Chip	GE Healthcare, München

**2.1.12 Laborgeräte und Zubehör**

Schüttelinkubatoren	<ul style="list-style-type: none"> <li>• BS 4 B (B. Braun, Melsungen)</li> <li>• HT (HT Infors AG, Basel)</li> <li>• Thermo Shaker PST-60H-4 (Lab4you, Berlin)</li> </ul>
Spektrophotometer	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ND 1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA)</li> <li>• Libra S11 (Biochrom, Cambridge, UK)</li> </ul>
Zentrifugen	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 5415D/5810R (Eppendorf, Hamburg)</li> <li>• Biofuge pico (Heraeus, Hanau)</li> <li>• Sorvall RC5/RC5B Plus (Kendro, Berlin)</li> </ul>

Rotationsplattformen	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Labortechnik Fröbel, Lindau</li> </ul>
Inkubationsschränke	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Typ BE 400 (Mettler, Schwabach)</li> </ul>
Heizblöcke	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Thermomixer comfort (Eppendorf, Hamburg)</li> </ul>
Sterilwerkbänke	<ul style="list-style-type: none"> <li>• LaminAir HLB 2472 (Heraeus, Hanau)</li> <li>• Herasafe (Kendro, Berlin)</li> </ul>
Waagen	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1205 MP (Sartorius, Göttingen)</li> </ul>
Thermocycler	<ul style="list-style-type: none"> <li>• DNAEngine (BioRad, München)</li> <li>• PTC-150 Minicycler™ (MJ Research, Waltham, USA)</li> </ul>
Geldokumentationsanlage	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gel Jet Imager (Intas, Göttingen)</li> </ul>
ELISA Washer	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Columbus Plus (Tecan, Crailsheim, Österreich)</li> </ul>
ELISA Reader	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tecan Sunrise (Tecan, Crailsheim, Österreich)</li> </ul>
Blot-Apparatur	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Trans-Blot Semi-Dry Transfer Cell (BioRad, München)</li> </ul>
Elektrophorese-Kammer	<ul style="list-style-type: none"> <li>• MiniProtein III Cell (BioRad, München)</li> </ul>
Mikroskope	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diavert (Leico, Solms)</li> <li>• CK2 (Olympus)</li> </ul>
Netzgeräte	<ul style="list-style-type: none"> <li>• EPS 301/601 (GE Healthcare, München)</li> <li>• PowerPac HC (BioRad, München)</li> </ul>
Reinstwasseranlage	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Arium 611 (Sartorius, Göttingen)</li> </ul>
Chromatographieplattformen	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Äkta prime (GE Healthcare, München)</li> </ul>
Sterilfiltrier-Einheit	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nalge (Nunc, Wiesbaden)</li> <li>• 0,2 µm/0,45 µm Celluloseacetatfilter (Sartorius AG, Göttingen)</li> </ul>
DNA-Sequenziergerät	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ABI Prism 310 Genetic Analyzer P.E. Applied Biosystems (Perkin Elmer, Waltham, USA)</li> </ul>
Oberflächenplasmonresonanz-Messgerät	<ul style="list-style-type: none"> <li>• BIACore2000 (GE Healthcare, München)</li> </ul>
Quarzresonator	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Institut für Mikrotechnik, TU Braunschweig</li> </ul>
Saugpumpen	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ISM 832 (Ismatec, Glattbrugg, Schweiz)</li> </ul>
Oszillatorschaltung	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Institut für Mikrotechnik, TU Braunschweig</li> </ul>
Frequenzzähler	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PM6682 (Philips, Stockholm, Schweden)</li> </ul>
Ventilschaltung	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Institut für Mikrotechnik, TU Braunschweig</li> </ul>
3-Wege-Ventile	<ul style="list-style-type: none"> <li>• LHDA 0531115H (LEE Hydraulische Miniaturkomponenten GmbH)</li> </ul>



### 2.1.13 Computerprogramme und Datenbanken

Finch TV 1.3.1	Bearbeitung und Auswertung von Elektropherogrammen (Geospiza Inc., Seattle, USA)
Vector NTI 10.1.1	Bearbeitung und Auswertung von Vektoren für Klonierungen (Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA)
QtiPlot	Statistische Datenauswertung, Graphische Darstellung von Daten (GNU General Public License)
BIAevaluation 4.1	Auswertung, Bearbeitung und Berechnung von Oberflächenplasmonresonanzdaten (GE Healthcare)
LabView 7.0	Aufnahme und graphische Darstellung von Quarzresonator-Frequenzen (National Instruments, Austin, USA)
Unicorn 5.10	Aufzeichnung und Darstellung von Chromatogrammen auf Äkta prime Plattformen (GE Healthcare, München)
SwissProt Protein Datenbank	Analyse von Proteinsequenzen und -strukturen (Swiss Institute of Bioinformatics, Genf)
VBASE2 Datenbank	Auswertung und Analyse von Antikörpergen-Sequenzen (Mollova <i>et al.</i> , 2007)
NCBI Datenbank	National Center for Biotechnology Information, USA

### 2.1.14 Sonstiges

Bradford-Reagenz (fünffach konzentriert)	BioRad, München
DNA Massenstandard	GeneRuler™ 100 bp Ladder Plus, MBI Fermentas, St. Leon Roth
Epitop-Bestimmung Peptid-Filter	AG Frank (Abt. Chemische Biologie, HZI)
Chelating Sepharose Fast Flow Matrix	GE Healthcare, München
Protein A-Säule	GE Healthcare, München
Superdex 200 10/300 GL	GE Healthcare, München
Sulfo-GMBS	Pierce (Rockford, USA)
CRP-Peptid-1	AG Frank (Abt. Chemische Biologie, HZI)
CRP	BiosPacific (Emeryville, USA)
Protein-Massenstandard	Precision Plus Protein Standard (BioRad, München)
Gelladepuffer (sechsfach konzentriert)	MBI Fermentas, St. Leon Roth
dNTPs	MBI Fermentas, St. Leon Roth

## **2.2 Mikrobiologische Methoden**

### **2.2.1 Anzucht von Bakterienstämmen**

Alle Bakterienstämme wurden in 2 x TY-Medium aufgezogen. Entsprechend wurden Ampicillin, Tetracyclin, oder Kanamycin sowie Glukose supplementiert. Für die Herstellung von Festmedien wurde 2 x TY-Medium mit 1,5 % Agar-Agar, sowie den entsprechenden Supplementen verwendet. Die Anzucht erfolgte ausgehend von einer Einzelkolonie oder einem Glycerinstock in Reagenzgläsern oder Erlenmeyerkolben bei 37 °C und 250 rpm in Schüttelinkubatoren über Nacht.

### **2.2.2 Bestimmung der OD<sub>600</sub> von Bakterienkulturen**

Die Messung der optischen Dichte von Bakterienkulturen erfolgte bei 600 nm im Photometer mit dem entsprechenden Kulturmedium als Referenzwert. Proteinüberexpressionen wurden stets bei einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,5 induziert.

### **2.2.3 Anlegen von Glycerinstocks**

Für die Langzeitaufbewahrung von Bakterienstämmen und Einzelklonen wurden 800 µl einer Übernachtskultur mit 200 µl 90 % (v/v) Glycerin versetzt, in ein 2 mL Mikro-Schraubröhrchen überführt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

### **2.2.4 Herstellung chemokompetenter Zellen**

100 mL 2 x TY-Medium mit den entsprechenden Supplementen wurden mit ca. 2 mL Übernachtskultur auf eine OD<sub>600</sub> > 0,1 beimpft und bei 37 °C und 250 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 inkubiert. Die Zellen wurden für 5 min bei 4 °C und 3220 x g pelletiert und in 40 mL eiskaltem TFB1 resuspendiert. Dann wurde 90 min auf Eis inkubiert und erneut 5 min bei 4 °C und 3220 x g pelletiert. Das Pellet wurde dann in 4 mL eiskaltem TFB2 vorsichtig resuspendiert und in 2 mL Mikro-Schraubröhrchen aliquotiert. Die Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren, die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

### 2.2.5 Transformation von *E. coli* XL-1 Blue mittels Hitzeschock

Zur Aufnahme von Plasmid-DNA wurden *E. coli* XL-1 Blue Zellen mit 1 µl Ligationsansatz oder Plasmid-DNA transformiert. Etwa 1 µl Ligationsansatz oder Plasmid-DNA wurden zu 50 µl chemokompetenten Zellen in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß gegeben und für 1 h auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für genau 60 s bei 42 °C und sofort danach Inkubation für 2 min auf Eis. Dann wurden 950 µl auf 37 °C vorgewärmtes SOC-Medium dazugegeben und 1 h bei 37 °C und 600 rpm inkubiert. Die Zellen wurden dann durch einminütiges Zentrifugieren bei 13 200 x g sedimentiert und auf 2 x TY-Agarplatten mit den entsprechenden Supplementen ausplattiert. Die Inkubation der Agarplatten erfolgte über Nacht bei 37 °C.

### 2.2.6 Produktion von scFv

Für die Produktion größerer Mengen scFv wurden 300 mL 2 x TY-GA Medium mit der Übernachtskultur eines *E. coli* XL-1 Blue-pOPE101-scFv-Klons auf eine OD<sub>600</sub> < 0,1 beimpft. Das Wachstum erfolgte bei 37 °C und 250 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von etwa 0,5. Dann wurde mit 50 µM IPTG die durch ein Lac-Operon regulierte Expression der scFv induziert. Nach ca. 20 h Inkubation bei 30 °C und 250 rpm wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 13 700 x g für 10 min sedimentiert, scFv aus dem Überstand wurden mit Ammoniumsulfat präzipitiert. Analog wurden scFv aus dem Periplasma der Zellen präpariert.

### 2.2.7 Produktion von scFv in Mikrotiterplatten

Zur proteinbiochemischen Analyse von α-CRP-scFv-Klonen wurden Einzelkolonien von Vereinzelungsausstrichen oder von Ausstrichen auf Agarplatten, die zum Titern der Elutionen nach den Selektionsrunden 2 und 3 dienten, verwendet.

Aus den Selektionen gegen CRP wurden jeweils 92 Einzelklone in einer Mikrotiterplatte analysiert. 180 µL 2 x TY-GA Medium wurden in Vertiefungen einer Polypropylen Mikrotiterplatten gegeben, mit Zellmaterial der Einzelkolonie beimpft und über Nacht bei 37 °C und 1000 rpm inkubiert. Mit 10 µL dieser Übernachtskultur wurden 180 µL 2 x TY-GA Medium beimpft und für 2 h bei 37 °C und 1000 rpm inkubiert. Die Zellen wurden für 10 min bei 3220 x g sedimentiert und in 190 µL 2 x TY-A Medium mit 50 µM IPTG resuspendiert. ScFv wurden über Nacht bei 30 °C und 1000 rpm exprimiert. Dann wurde 10 min bei 3220 x g zentrifugiert und der

scFv-haltige Kulturüberstand in eine neue Polypropylen Mikrotiterplatte transferiert. Dieser wurde für proteinbiochemische Untersuchungen in einem indirekten Antigen-ELISA eingesetzt.

### 2.3 Molekularbiologische Methoden

#### 2.3.1 Präparation von *E. coli* XL-1 Blue Plasmid-DNA

Um Plasmid-DNA aus *E. coli*-Stämmen zu isolieren, wurde eine Übernachtskultur in 30 ml 2 x TY-Medium mit Antibiotikum der entsprechenden Resistenzen sowie Glukose angesetzt. 2 mL Kultur wurde in einem 2 mL Reaktionsgefäß zweimal nacheinander für 1 min bei 13 200 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 300 µL Suspensionspuffer resuspendiert, 300 µL Lysispuffer wurden für die Bakterienlyse hinzugegeben. Nach 3 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden 300 µL Neutralisierungspuffer zugefügt, 15 min auf Eis inkubiert und anschließend 15 min bei 13 200 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 2 mL Reaktionsgefäß transferiert, und es wurde wieder zentrifugiert, um Zellreste zu entfernen. Der Überstand wurde erneut in ein frisches 2 mL Reaktionsgefäß überführt und die DNA wurde mit 1 mL Isopropanol gefällt. Es wurde für 15 min bei 13 200 x g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zur Entsalzung wurden 500 µL 70 % (v/v) Ethanol zugefügt und für 10 min bei 13 200 x g und 4 °C zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt, der Überstand abpipettiert und das Pellet bei 37 °C für ca. 30 min getrocknet. Die DNA wurde dann in 50-100 µL H<sub>2</sub>O aufgenommen.

#### 2.3.2 Präparation von *E. coli* XL-1 Blue Plasmid-DNA mittels *Qiagen® Plasmid Midi Kit (100)* Kit

Für Präparationen endotoxinfreier Plasmid-DNA wurde das *Qiagen Plasmid Midi Kit (100)* verwendet. Die Aufreinigung erfolgte nach Herstellerangaben, eluiert wurde mit 500 µL H<sub>2</sub>O. Derartig präparierte DNA wurde für die Transfektion von HEK293T Zellen verwendet.

#### 2.3.3 Amplifikation von DNA via Kolonie-PCR

Der Erfolg einer Klonierung, bzw. Analysen von scFv-Inserts wurden mittels Kolonie-PCR durchgeführt.

In dem PCR-Ansatz (Tab. 1A) wurde Zellmaterial von Einzelkolonien resuspendiert. Die

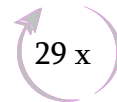
*Annealing*-Temperatur variierte je nach verwendeten Oligonukleotiden und die Elongationszeit je nach Amplifikatgröße (Tab.1B).

A

Red Taq 10 x PCR- Reaktionspuffer	2 µL
10 pmol Oligonukleotid <i>forward</i>	0,2 µL
10 pmol Oligonukleotid <i>reverse</i>	0,2 µL
dNTPs	0,4 µL
Red Taq DNA Polymerase	0,4 µL
H <sub>2</sub> O	ad 20 µL

B

1 min	94 °C
30 s	94 °C
30 s	54-64 °C
60 s/1 kb	72 °C
10 min	72 °C



**Tab. 1: Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes und Temperaturverlauf einer PCR.** A: angegeben sind Reaktionspuffer, das Amplifikat flankierende Oligonukleotide, desoxy-Nukleotide, sowie Puffer und Wasser. B: in dem aufgeführten Standardprogramm variieren *Annealing*-Temperatur je nach verwendeten Oligonukleotiden und die Elongationszeit je nach Amplifikatgröße. Der vorangehende Denaturierungsschritt bei 94 °C und die Abschlusselongation bei 72 °C für 10 min blieben unverändert. Nach den aufgeführten Schritten wurde der Ansatz bis zur Weiterverarbeitung auf 16 °C temperiert.

Anschließend erfolgte eine gelelektrophoretische Auftrennung der Amplifikate im Agarosegel.

### 2.3.4 Restriktionsverdau

Zur Erzeugung von DNA-Fragmenten definierter Länge wurde Plasmid-DNA enzymatisch mit Restriktionsendonukleasen Typ II gespalten. Puffer, Enzyme und Zusätze wurden zu der DNA nach Herstellerangaben supplementiert (Tab. 2). Die Restriktion erfolgte für 3-16 h bei dem Temperaturoptimum der verwendeten Restriktionsendonukleasen. Anschließend erfolgte die Inaktivierung der Enzyme für 20 min bei 65 °C oder 85 °C. Anschließend wurde der Restriktionsansatz aufgereinigt oder dephosphoryliert.

Puffer (10 x konzentriert)	2 µL	
Restriktionsendonuklease	1 µL/Restriktionsendonuklease	1-50 U
BSA	0-0,2 µL	2 µg
DNA	1-17 µL	ca. 1 µg
H <sub>2</sub> O	ad 20 µL	

**Tab. 2: Volumen und Mengen an DNA, Enzymen und Supplementen für einen Restriktionsansatz.** 1 µg DNA wurde mit mindestens 1 U pro Restriktionsendonuklease für min. 3 h gespalten. Enzym-kompatibler Puffer wurde nach Herstellerangaben verwendet, 2 µg BSA wurden, wenn angegeben, supplementiert.

### 2.3.5 Dephosphorylierung endständiger 5'-DNA-Phosphatgruppen

Um Phosphatgruppen am 5'-Ende von Nukleinsäuren für eine darauffolgende Ligation zu entfernen, wurden diese enzymatisch mittels SAP (*shrimp alkaline phosphatase*) abgespalten. Die Dephosphorylierung erfolgte direkt nach der Restriktion von DNA-Fragmenten und der Inaktivierung der Restriktionsendonukleasen. 1 µL SAP wurde in den inaktivierten Restriktionsansatz gegeben und 30 min bei 37 °C inkubiert, darauf wurde erneut 1 µL SAP zu dem Ansatz gegeben und wieder wie oben inkubiert. Anschließend wurde das Enzym für 15 min bei 65 °C inaktiviert. Nach der Dephosphorylierung wurde die DNA für eine Ligation eingesetzt.

### 2.3.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Um die kohäsiven Enden zweier DNA-Fragmente zu ligieren wurde eine Ligation mit T4-DNA-Ligase und den entsprechenden Puffern durchgeführt (Tab. 3) und der gesamte Ansatz über Nacht bei 16 °C inkubiert.

T4 DNA-Ligase 10 x Buffer	1 µL
T4 DNA-Ligase, 0,6 U	0,2 µL
Vektor-DNA	50 ng
Insert-DNA	Molares Verhältnis 1:3, für ein scFv-Insert: 21 ng
H <sub>2</sub> O	ad 10 µL

**Tab. 3: Volumen und Mengen an DNA und Enzymen für einen Ligationsansatz.** Vektor-DNA und Insert-DNA wurden im molaren Verhältnis 1:3 mit Ligase und Ligasepuffer über Nacht bei 16 °C inkubiert.

Der Ligationsansatz wurde direkt für eine Hitzeschock-Transformation in *E. coli* XL-1 Blue Zellen verwendet.

### 2.3.7 Agarose-Gelelektrophorese

Die gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in einem 1 % (w/v) Agarosegel bei 110 V im TAE-Puffersystem. Die DNA-Proben wurden im Verhältnis 6:1 mit 6 x konzentriertem Gelladepuffer versetzt, während der Elektrophorese wurde ein DNA-Standard als Größen-Referenz mitgeführt. Das Agarosegel wurde mit 25 ng/mL des interkalierenden Farbstoffes Ethidiumbromid versetzt, um nachfolgend die DNA mittels UV-Licht zu detektieren.

### 2.3.8 Aufreinigung von DNA aus Lösungen und Agarosegelen

Um DNA oder DNA-Fragmente von Proteinen, Salzen und kleineren DNA-Fragmenten zu befreien, oder um sie aus Agarosegelen zu reinigen, wurden sie mittels des *GFX DNA and Gel Band Purification Kits* gemäß den Herstellerangaben aufgereinigt. Eluiert wurde anschließend mit einem Volumen von 20-60 µl. Reinheit und Konzentration der gereinigten DNA wurde photometrisch oder in einem Agarosegel bestimmt.

### 2.3.9 Quantifizierung von DNA in Lösungen

Um die DNA-Konzentration einer Lösung zu quantifizieren und die Reinheit zu bestimmen, wurde die Absorption bei 260 und 280 nm gemessen. Für doppelsträngige DNA gilt dabei:

$$OD_{260} \times 50 = \mu\text{g DNA/mL}$$

Für eine reine DNA-Lösung gilt:

$$OD_{260}/OD_{280} = 1,8$$

Werte über 1,8 verweisen auf Verunreinigungen durch RNA, Werte darunter auf Verunreinigungen durch Proteine oder organische Chemikalien.

### 2.3.10 Präzipitation von DNA aus Lösungen

Zum Aufreinigen und Entsalzen wässriger DNA-Lösungen wurde die DNA ausgefällt, gewaschen und in H<sub>2</sub>O resuspendiert. Dazu wurde das Volumen der DNA-Lösung mit H<sub>2</sub>O auf 100 µL aufgefüllt und die DNA mit 10 µL 3 M Natriumacetat, pH 5,2 und 250 µL 100 % (v/v) Ethanol für 3 min bei Raumtemperatur gefällt. Die DNA wurde für 5 min bei 13 200 x g pelletiert und zweimal mit 500 µL 70 % (v/v) Ethanol und Zentrifugation für 2 min bei 13 200 x g gewaschen. Das DNA-Pellet wurde an der Luft getrocknet und in 10-50 µL H<sub>2</sub>O oder Puffer aufgenommen. Derartig präparierte DNA wurde für Sequenzierungen eingesetzt.

### 2.3.11 Sequenzierung von Plasmid-DNA und DNA-Fragmenten (modifiziert nach Sanger *et al.*, 1975)

Für die Sequenzierung von Plasmid-DNA oder DNA-Fragmenten wurde die Ausgangs-DNA mit fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleosidtriphosphaten amplifiziert (Tab. 4). Die dadurch

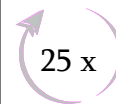
verursachten vorzeitigen DNA-Strangabbrüche führten zu einer statistisch gleichmäßigen Verteilung unterschiedlich langer DNA-Fragmente. Der Sequenzier-PCR-Ansatz wurde zur Entfernung von Salzen, Polymerase und Nukleosidtriphosphaten gefällt und in H<sub>2</sub>O aufgenommen. Die gelöste DNA wurde für 2 min bei 94 °C erhitzt und dann in 0,5 mL Sequenziergefäße überführt. Nach Kapillarelektrophorese wurde die Sequenz der Ausgangs-DNA ermittelt.

A

DNA (30 ng PCR-Produkt, 300 ng Plasmid-DNA)	
BigDye Reagenz (Applied Biosystems)	1 µL
Oligonukleotide (10 pmol/µL)	1 µL
TSR-Puffer (Applied Biosystems)	2 µL
H <sub>2</sub> O	ad 10 µL

B

1 min	96 °C
30 s	96 °C
15 s	50 °C
4 min	60 °C



**Tab. 4: Zusammensetzung und Temperaturverlauf eines Sequenzier-PCR-Ansatzes.** A: der Ansatz setzt sich aus BigDye Reagenz und Sequenzier-Puffer aus dem *Big Dye Terminator Sequencing Kit*, sowie Oligonukleotid und DNA zusammen, wobei 30 ng PCR-Produkt oder 300 ng Plasmid-DNA verwendet wurden. B: die Sequenzierreaktion erfolgte bei einer *Annealing*-Temperatur von 50 °C für 15 s und 4 minütiger Elongationszeit in 25 Zyklen.

## 2.4 Generierung humaner rekombinanter Antikörperfragmente

### 2.4.1 Herstellung von M13-Phagen

Für die Herstellung von Antikörpergen-Bibliotheken oder nach Selektionen mit diesen wurden scFv-tragende M13-Phagen produziert.

Dazu wurde eine Übernachtskultur in 2 x TY-GA Medium mit Phagmid-tragenden Bakterien hergestellt. Mit dieser wurde die Hauptkultur in 2 x TY-GA Medium inokuliert. Analog konnten nach einer Selektion von Antikörpergen-Bibliotheken abgeschwemmten Kolonien von Agarplatten als Inokulum dienen. Das Wachstum der Kultur erfolgte bei 37 °C und 250 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5. 5 mL Kultur, bzw. 25 mL für die Herstellung einer M13-Antikörpergen-Bibliothek, wurden mit einer MOI von 20 mit M13K07 Helferphagen für monovalente scFv-Präsentation oder mit *Hyperphage* für polyvalente scFv-Präsentation infiziert. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen für 10 min bei 3220 x g sedimentiert und in 2 x TY-AK Medium resuspendiert. Es wurde über Nacht bei 30 °C und 250 rpm inkubiert, anschließend wurden die produzierten Phagen für 3 h mit 1/5 des Überstandvolumens



20 % (w/v) PEG/2,5 M NaCl auf der Wippe auf Eis gefällt. Die Phagen wurden dann für 60 min bei 3220 x g und 4 °C sedimentiert. Der Überstand wurde gut abgenommen und das Phagenpellet in 1 mL PBS resuspendiert. Es folgte eine Titerbestimmung der Phagen.

### 2.4.2 Titerbestimmung von M13-Phagen

Für die Bestimmung der Menge infektiöser Phagen in einer Lösung wurde der Phagentiter bestimmt. Dazu wurden je 50 µL *E. coli* XL-1 Blue-Kultur mit einer OD<sub>600</sub> von 0,5 mit seriellen 1:10-Phagenverdünnungen infiziert, 30 min bei 37 °C inkubiert und auf 2 x TY-GA Agarplatten ausplattiert. Durch Auszählen der Kolonien auf den Agarplatten und Einberechnung des Verdünnungsfaktors der Phagenverdünnung wurde der Titer der Phagenlösung bestimmt.

### 2.4.3 Selektion scFv-präsentierender Phagen

Zur Selektion CRP-spezifischer scFv wurden die humanen, semisynthetischen auf dem Vektor pIT2-basierenden Antikörpergen-Bibliotheken Tomlinson I und J (Goletz *et al.*, 2002), sowie die beiden naiven Antikörpergen-Bibliotheken HAL4 und HAL7 (Hust *et al.*, 2007) verwendet. Es wurden 150 ng Protein oder Peptid/BSA-Konjugat in 150 µl PBS über Nacht bei 4 °C auf der Oberfläche der Kavitäten von Polystyrol-Immunostripes adsorptiv immobilisiert, analog dazu wurde jeweils 2 % (w/v) MPBST, bzw. Sulfo-GMBS/BSA für Selektionen gegen an BSA gekoppelte Peptide, in einer Vertiefung inkubiert. Diese Vertiefungen dienten zur Deselektion unspezifisch bindender scFv-Phagen.

Die Antikörpergen-Bibliotheken lagen in dem Helferphagen *Hyperphage* für polyvalente Präsentation vor, scFv-Phagen aus späteren Selektionsrunden lagen in dem Helferphagen M13K07 für monovalente Präsentation vor. Für die erste Selektionsrunde wurden 1 x 10<sup>12</sup> cfu in 2 % (w/v) MPBST für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Parallel wurden freie Bindungsstellen in der Selektionsvertiefung mit 2 % (w/v) MPBST abgesättigt. Unspezifisch bindende scFv-Phagen aus der Antikörpergen-Bibliothek wurden in der mit 2 % (w/v) MPBST, bzw. Sulfo-GMBS/BSA für Selektionen gegen an BSA gekoppelte Peptide, inkubierten Vertiefung für 1 h bei Raumtemperatur auf der Wippe deselektiert. Das deselektierte scFv-Phagen-Gemisch wurde dann für 1,5 h bei Raumtemperatur auf der Wippe in der mit dem Antigen gekoppelten Vertiefung inkubiert. Nach der Inkubation auf dem Antigen wurde harsch und stringent mit

0,05 (v/v) % PBST gewaschen. Nach der ersten Selektionsrunde wurde zehnmal gewaschen, mit jeder weiteren Runde wurden zehn Waschschr tte addiert. Abschließend wurden die gebundenen Phagen enzymatisch mit 200 µL 10 µg/mL Trypsin eluiert und der Phagentiter des Eluats bestimmt. Die eluierten Phagen wurden zur Infektion einer *E. coli* XL-1 Blue Kultur verwendet, die sich in der exponentiellen Phase bei einer OD<sub>600</sub> von 0,5 befand. Dazu wurden 20 mL der Zellen mit den eluierten Phagen versetzt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Danach folgten weitere 30 min Inkubation bei 37 °C und 250 rpm. Die Zellen wurden für 10 min bei 3220 x g sedimentiert, das Pellet in 300 µL 2 x TY-Medium aufgenommen und die Zellen auf 2 x TY-GA Agarplatten mit einem Durchmesser von 15 cm ausplattiert. Die Inkubation der Agarplatten erfolgte bei 37°C über Nacht.

## 2.5 Proteinbiochemische Methoden

### 2.5.1 Reinheitsbestimmung von CRP über analytische Gelausschlusschromatographie

Für Reinheitsbestimmungen von Proteinen und die Analyse, ob Proteine vollständig, aggregiert oder partiell abgebaut vorlagen, wurde eine analytische Gelausschlusschromatographie durchgeführt. Dafür wurde eine mit entgastem PBS  quiliibrierte Superdex 200 10/300 GL Säule an der  kta *prime* verwendet. Als Referenzproteine dienten Chymotrypsin (25 kD), Albumin (68 kD), Ovalbumin (45 kD) und Ribonuklease A (13,7 kD) aus dem *HMW Calibration Kit*. 500 µL Protein in einer Konzentration von 100 µg/mL wurden in die Probenschleife injiziert, der Fluß erfolgte mit einer Geschwindigkeit von 0,5 mL/min, die Absorption bei 280 nm wurde während der Chromatographie aufgezeichnet. Fraktioniert wurde in Aliquots zu 0,5 mL. Die Proteine in den Fraktionen wurden fakultativ in einem 10 % oder 12 % SDS-PAA-Gel gelelektrophoretisch aufgetrennt.

### 2.5.2 Präparation von scFv aus dem Periplasma von *E. coli* XL-1 Blue

Nach der Expression von scFv in *E. coli* XL-1 Blue wurden die in das Periplasma der Zellen transportierten scFv präpariert. Dazu wurde das Zellpellet in 1/10 des Kulturvolumens in PE-Puffer resuspendiert und für 20 min auf Eis unter regelmäßigem Mixen inkubiert. Zellen und Zelltrümmer wurden bei 3220 x g für 10 min und 4 °C sedimentiert und der scFv-haltige Überstand über Nacht bei 4 °C unter R hren gegen PBS in Dialyseschläuchen mit einer

Ausschlußgröße von 12000-14000 Da dialysiert.

### **2.5.3 Fällung von scFv aus dem Kulturüberstand von *E. coli* XL-1 Blue**

Nach der Expression von scFv in *E. coli* XL-1 Blue wurden scFv aus dem Überstand mit dem chaotropen Salz Ammoniumsulfat ausgefällt. Ammoniumsulfat wurde bis oberhalb der Löslichkeitsgrenze zu dem Kulturüberstand gegeben, für die Ausfällung von scFv in dem Mengenverhältnis 40 g/100 mL Kulturüberstand. Die Fällung erfolgte bei 4 °C unter stetigem Rühren unter Zugabe von kleinen Portionen Ammoniumsulfat. Die aus dem Überstand gefällten scFv wurden bei 13 700 x g für 30 min und 4 °C zentrifugiert, das Pellet wurde in 10 mL PBS resuspendiert und über Nacht bei 4 °C unter Rühren gegen PBS in Dialyseschläuchen mit einer Ausschlußgröße von 12000-14000 Da dialysiert.

### **2.5.4 Indirekter Antigen-ELISA**

Für die Mengenbestimmung funktionaler scFv oder modifizierter scFv wurde ein indirekter Antigen-ELISA in Maxisorp-Mikrotiterplatten (Nunc) durchgeführt.

Die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte wurden über Nacht mit 100 µL einer 1 µg/mL Antigenlösung in PBS oder Natriumcarbonatpuffer inkubiert. Am nächsten Tag wurden freie Bindungsstellen mit 350 µL pro Vertiefung 2 % (w/v) MPBST abgesättigt und für 1 h bei Raumtemperatur auf der Wippe inkubiert. Es wurde dreimal mit 0,05 % (v/v) PBST im ELISA-Washer gewaschen und 100 µL zu testender scFv oder modifizierter scFv in verschiedenen Verdünnungen in 2 % (w/v) MPBST für 2 h bei Raumtemperatur auf der Wippe inkubiert. Nach erneutem Waschen der Kavitäten erfolgte die Inkubation mit 100 µL Maus α-myc-Tag IgG oder dem entsprechenden Nachweisantikörper nach Herstellerangaben verdünnt in 2 % (w/v) MPBST für 1,5 h auf der Wippe bei Raumtemperatur. Es wurde wieder wie oben gewaschen und mit Ziege α-Maus HRP-konjugierten IgG nach Herstellerangaben verdünnt in 2 % (w/v) MPBST für 1,5 h auf der Wippe bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift wurden 100 µL TMB-Substratlösung je Vertiefung zugegeben und bis zu einer ausreichend blauen Färbung inkubiert. Abgestoppt wurde die Reaktion mit 100 µL 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> je Vertiefung, die Messung der gelben Färbung erfolgte bei 450 nm im ELISA-Reader und einer Referenzwellenlänge von 620 nm.

### 2.5.5 *Human-Capture-ELISA*

Für die Mengenbestimmung funktionaler scFv-Fc-Fusionsproteine nach der Expression in HEK293T Zellen aus dem Überstand wurde ein *Human-Capture-ELISA* durchgeführt. 100 µL einer nach Herstellerangaben verdünnten polyklonalen α-human IgG Lösung in Natriumcarbonatpuffer wurden in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte (Falcon) gegeben und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Zum Absättigen freier Bindestellen wurden 200 µL 100 % FCS (*fetal calf serum*) auf die Lösung in den Vertiefungen gegeben und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschliessend wurden die Vertiefungen im ELISA- *Washer* mit 0,05 % (v/v) PBST gewaschen. Die Proben wurden in den Verdünnungen 1/10 und 1/30 für 1,5 h bei 37 °C in den Vertiefungen inkubiert. Analog wurden Verdünnungen mit Protein N als Referenz in den Vertiefungen inkubiert. Nach wiederholtem Waschen der Vertiefungen wurden 100 µL HRP-konjugierte α-human IgG (γ-Kette) nach Herstellerangaben verdünnt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift wurden 100 µL TMB-Substratlösung je Vertiefung zugegeben, inkubiert wurde bis zu einer ausreichend blauen Färbung. Abgestoppt wurde die Reaktion mit 100 µL 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> je Vertiefung, die Messung der gelben Färbung erfolgte bei 450 nm im ELISA-Reader und einer Referenzwellenlänge von 620 nm.

### 2.5.6 *CRP-Sandwich-ELISA*

Um Kopplungseffizienz und Funktionalität CRP-spezifischer scFv oder scFv-Fc-Fusionsproteine zu bestimmen, wurde ein *CRP-Capture-ELISA* durchgeführt. 100 µL CRP-spezifische scFv oder scFv-Fc-Fusionsproteine in PBS wurden in die Wells einer Maxisorp-Mikrotiterplatte (Nunc) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Zum Absättigen freier Bindestellen wurden 350 µL Absättigungsreagenz in die Vertiefungen gegeben und für 1 h bei Raumtemperatur auf der Wippe inkubiert. Anschliessend wurden die Vertiefungen im ELISA- *Washer* mit 0,05 % (v/v) PBST gewaschen. 10 µg/mL CRP wurde in den Vertiefungen für 1,5 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Waschen der Vertiefungen wie oben wurden 100 µL 3,4 µg/mL Maus α-CRP-IgG für 1,5 h bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde wieder gewaschen und mit Ziege α-Maus spezifischen, HRP-konjugierten IgG in 2 % (w/v) MPBST für 1,5 h auf der Wippe bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift wurden 100 µL TMB-Substratlösung je Vertiefung zugegeben; inkubiert wurde bis zu einer ausreichend blauen Färbung. Abgestoppt wurde die

Reaktion mit 100  $\mu\text{L}$  1 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  je Vertiefung, die Messung der gelben Färbung erfolgte bei 450 nm im ELISA-Reader und einer Referenzwellenlänge von 620 nm

### 2.5.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen und Proteinuntereinheiten wurde eine diskontinuierliche SDS-PAGE durchgeführt. CRP und scFv wurden in einem 12 % (w/v) SDS-PAA-Gel (Tab. 5) aufgetrennt, Proteine mit einer höheren molekularen Masse in einem 10 % (w/v) Gel.

	Trenngel (10 %)	Trenngel (12 %)	Sammelgel
$\text{H}_2\text{O}$	1,6 mL	1,3 mL	1,0 mL
30 % (w/v) Acrylamid-Mix	1,3 mL	1,6 mL	0,26 mL
TrisHCl	1,0 mL (1,5 M, pH 8,8)	1,0 mL (1,5 M, pH 8,8)	0,2 mL (1 M, pH 6,8)
10 % (w/v) SDS	40 $\mu\text{L}$	40 $\mu\text{L}$	15 $\mu\text{L}$
10 % (w/v) APS	40 $\mu\text{L}$	40 $\mu\text{L}$	15 $\mu\text{L}$
TEMED	2 $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$

**Tab. 5: Lösungen und Puffer für SDS-PAA-Gele.**

Die Polymerisation der einzelnen Gele erfolgte jeweils für einen Zeitraum von ca. 20-30 min. Unterdessen wurden die Proteine für eine reduzierende Gelelektrophorese mit 5 x konzentriertem Laemmli-Puffer im Verhältnis 6:1 versetzt und für 5 min bei 95 °C aufgekocht. Nach Auftragen der Proteinproben auf das vorbereitete Gel wurden die Proteine in SDS-Laufpuffer bei 300 V und 20 mA für 45 min bis zum Austreten der blauen Bromphenolblaubande elektrophoretisch aufgetrennt. Abschließend wurde das Gel mittels Silberfärbung gefärbt oder die Proteine mittels Western-Blot auf PVDF-Membran transferiert und immunologisch gefärbt.

### 2.5.8 Silberfärbung von Polyacrylamidgelen

Für die Anfärbung von Proteinen in einem SDS-PAA-Gel wurden die Proteine zuerst mittels

Fixierlösung für mindestens 2 h bei Raumtemperatur in dem Gel denaturiert. Es folgten 3 x 20 min Waschen mit 50 % (v/v) Ethanol und 1 min Inkubation in 0,02 % (w/v) Natriumthiosulfatlösung. Dann wurde das Gel dreimal für 20 s mit H<sub>2</sub>O gewaschen und darauf für 20 min auf der Wippe bei Raumtemperatur in Silberlösung inkubiert. Es folgten 2 Waschschrte für 20 s mit H<sub>2</sub>O und dann Entwicklung für 1-10 min in Entwickler bis zum Sichtbarwerden der Banden. Nach zweimal Waschen für 2 min mit H<sub>2</sub>O wurde die Entwicklung mit Stopplösung abgestoppt. Das Gel wurde in H<sub>2</sub>O gelagert.

### 2.5.9 Western-Blot

Mittels Western-Blot im *semi-dry*-Verfahren wurden Proteine elektrophoretisch auf PVDF-Membran transferiert. Dafür wurden zuerst drei 10 x 7 cm Filterpapiere (GB 002, Schleicher & Schüll) mit Laufpuffer getränkt und luftblasenfrei auf die Elektrodenplatte gelegt. Es folgte die in Methanol aktivierte PVDF-Membran, auf die das Polyacrylamidgel gelegt wurde. Schließlich folgten noch vier weitere angefeuchtete Filterpapiere. Der Transfer erfolgte bei 20 V und 5,5 mA/cm<sup>2</sup>, für ein Gel also bei 630 mA für 30 min.

### 2.5.10 Immunfärbung

Für die spezifische Anfärbung von produzierten scFv oder scFv-Fc-Fusionsproteinen, sowie für Tests von  $\alpha$ -CRP-scFv auf reduzierend aufgetrenntes CRP wurde eine Immunfärbung durchgeführt. Nach dem Transfer der Proteine mittels Western-Blot auf eine PVDF-Membran wurden freie Bindungsstellen auf der Membran mit einer 2 % (w/v) MPBST abgesättigt. Die Inkubation mit dem Erstantikörper in 2 % (w/v) MPBST erfolgte bei Raumtemperatur für 2 h auf der Wippe. Die Membran wurde dreimal mit 0,05 % (v/v) PBST gewaschen und der jeweilige HRP-konjugierte Zweitantikörper wurde für 1,5 h bei Raumtemperatur auf der Wippe inkubiert. Es wurde dreimal mit 0,05 % (v/v) PBST gewaschen und die Membran mit Substratpuffer äquilibriert. Anschließend wurde in Substratlösung bis zum Eintreten der Färbung entwickelt. Die Färbung wurde durch Waschen mit H<sub>2</sub>O gestoppt, die Membran wurde zwischen 2 Filterpapieren getrocknet.

### 2.5.11 Reinigung von scFv-Fc-Fusionsproteinen über Protein A

Für die Aufreinigung von scFv-Fc-Fusionsproteinen aus Zellkulturüberständen wurde eine Affinitätschromatographie mittels Protein A an einer Äkta *prime* Plattform durchgeführt.

Vor Durchführung der Chromatographie wurden alle Puffer, Lösungen und Proben steril filtriert, entgast und auf 4 °C temperiert. Die Fließgeschwindigkeit wurde auf 1 mL/min eingestellt. Die Protein A-Säule wurde zuerst mit ca. 20 mL Bindepuffer äquilibriert. Dann wurde der scFv-Fc-Fusionsprotein enthaltende Zellkulturüberstand über die Säule geleitet und mit Bindepuffer nachgewaschen. Es folgte ein Waschen der Säule mit Waschpuffer, bis das UV-Signal bei 280 nm eine konstante Basislinie zeigte. Anschließend wurden mit dem sauren Elutionspuffer gebundene scFv-Fc-Fusionsproteine in Fraktionen von 1 mL eluiert, der im sauren Bereich liegende pH-Wert der Fraktionen wurde dann mit Neutralisierungspuffer neutralisiert und die Fraktionen im SDS-PAA-Gel, sowie im *Human-Capture*-ELISA analysiert.

### 2.5.12 Reinigung von scFv über Nickel-Chelat-Sepharose

Nach der Präparation von scFv aus Expressionsüberständen und dem Periplasma von *E. coli* XL-1 Blue Zellen, wurden die scFv über ihren His-Tag mittels Nickel-beladener *Chelating Sepharose<sup>TM</sup> Fast Flow Matrix* über IMAC (*Immobilized Metal ion Affinity Chromatography*) gereinigt.

Die gegen PBS dialysierte Periplasma-Präparation und der gefällte Kulturüberstand wurden mit final 10 mM Imidazol und final 0,5 M NaCl versetzt und mit 500 µL nach Herstellerangaben vorbereiteter, Ni<sup>2+</sup>-beladener Sepharosematrix für mindestens 2 h auf der Wippe auf Eis inkubiert. Es wurde dann für 5 min bei 500 x g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen. Dann wurde einmal mit dem fünffachen Matrixvolumen Bindepuffer gewaschen und wie oben zentrifugiert. Es folgten 3 weitere Waschschrte mit dem gleichen Volumen Bindepuffer mit 30 mM Imidazol, die äquivalent zum ersten Waschschrte durchgeführt wurden, dann ein Äquilibrierungsschrte mit dem gleichen Volumen PBS und dann dreimalige Elution mit dem zweifachen Matrixvolumen PBS mit 0,1 M EDTA. Die Elutionsfraktionen wurden über Nacht bei 4 °C gegen PBS dialysiert und bei -20 °C gelagert.

### 2.5.13 Bestimmung der Dissoziationskonstante $K_D$ mittels BIAcore2000

Die Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) von scFv wurde über Oberflächenplasmonresonanz (SPR; *surface plasmon resonance*) mittels BIAcore2000 bestimmt.

Dazu wurde ein dextranbeschichteter BIAcore CM5 Chip mittels Aminokopplung kovalent mit dem Liganden CRP beladen. Die Aktivierung des Chips erfolgte mit 0,1 M NHS und 0,4 M EDC, die Kopplung von CRP an den Chip mit 10 mM Natriumacetat, pH 5,0 und einer 2,5 µg/mL CRP-Lösung und die Absättigung des Chips mit Ethanolamin. Als Laufpuffer wurde PBS verwendet, Regenerationsschritte wurden mit 50 mM NaOH durchgeführt. Die Fließgeschwindigkeit betrug 30 µL/min, ein Volumen von insgesamt 50 µL pro Probe wurde injiziert. Als Negativkontrolle erfolgte ein Fluß der Analyten über Lysozym. Die Oberflächenplasmonresonanz-Messungen der scFv erfolgte in den Konzentrationen 1 nM, 3 nM, 10 nM, 30 nM und 100 nM mit mindestens einer Doppelbestimmung mittels der Injektionsoption *Kinject*, die Auswertung der aufgenommenen Daten und die Berechnung der Kinetiken erfolgte mit der Evaluationssoftware „BIAevaluation 4.1“.

### 2.5.14 Bestimmung der Antigenbindestelle CRP-spezifischer scFv mittels BIAcore2000

Für Untersuchungen, ob verschiedene scFv dasselbe oder unterschiedliche Epitope auf einem Protein erkennen, wurde eine stufenweise Co-Injektion zweier Antikörper über CRP mit paralleler Massebestimmung an der BIAcore2000 durchgeführt.

Wie für Kinetik-Messungen mittels BIAcore2000 wurde ein dextranbeschichteter BIAcore CM5 Chip mittels Aminokopplung kovalent mit dem Liganden beladen. Mittels der Option *Coinject* wurden nacheinander zwei scFv in äquimolaren Mengen mit einer Flussgeschwindigkeit von 30 µL/min über den Chip geleitet. Die Auswertung der aufgenommenen Daten erfolgte mit der Evaluationssoftware „BIAevaluation 4.1“.

### 2.5.15 Bestimmung der Antigenbindestelle CRP-spezifischer scFv mittels Peptidmembranen

Für die Bestimmung der Epitope, an welche CRP-spezifische scFv binden, wurde CRP als Serie sich überlappender Peptidsequenzen (15-mere) auf modifizierten Whatman-Filterpapieren über Aminokopplung synthetisiert (HZI, Abteilung Chemische Biologie) und CRP-spezifische scFv auf



dieser inkubiert.

Die Filterpapiere wurden in 2 % (w/v) MPBST für 1 h bei Raumtemperatur auf einer Wippe inkubiert, um freie Bindestellen auf dem Filterpapier abzusättigen. Das Filterpapier wurde dann für 2-3 h mit CRP-spezifischen scFv in einer finalen Konzentration von mindestens 5 µg/mL in 2 % (w/v) MPBST inkubiert. Danach wurde dreimal mit 0,05 % (v/v) PBST gewaschen und mit Maus α-myc-Tag IgG inkubiert. Anschließend wurde nochmals gewaschen und mit AP-konjugierten Ziege α-Maus IgG inkubiert. Dann wurde zweimal für 10 min mit TBST und zweimal für 10 min mit CBS gewaschen. Anschließend wurde mit Färbelösung gefärbt, nach ausreichender Entwicklung der *Spots*, bzw. Kontrollen wurde dreimal mit PBS gewaschen, um die Färbung abzustoppen. Anhand der Lokalisation der Peptide auf der Membran konnten die Peptidsequenzen der angefärbten Bereiche bestimmt werden.

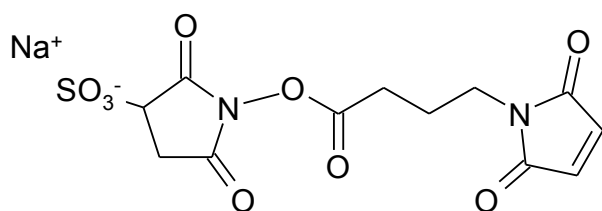
### 2.5.16 Entfärben von Peptidmembranen

Um Peptidmembranen nach Immunfärbung für eine erneute Epitopbestimmung einzusetzen, wurden die gebundenen scFv entfernt.

Dazu wurde zweimal mit H<sub>2</sub>O gewaschen und einmal mit 100 % DMF. Es folgte eine erneute Inkubation mit DMF und Ultraschall bis die Farbe vollständig verschwunden war. Nach dreimaligem Waschen mit H<sub>2</sub>O wurde dreimal mit Puffer A im Ultraschallbad gewaschen. Danach wurde dreimal mit Puffer B und dann dreimal mit 100 % Ethanol gewaschen. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C bis zur Verwendung mit dem nächsten zu analysierenden scFv.

### 2.5.17 Kopplung von CRP-Peptiden an BSA

Für die Kopplung von Oligopeptiden an BSA wurde der heterobifunktionale Crosslinker N-[γ-maleimidobutyryloxy]sulfo-succinimid-Ester (Sulfo-GMBS) (Abb. 5) verwendet. Dieser Linker besitzt eine gute Löslichkeit in Wasser und eignet sich daher für die Kopplung an wasserlösliche Peptide. Weiterhin besitzt er eine geringe Immunogenität (Kitagawa *et al.*, 1981).



**Abb. 5: Molekülstruktur von Sulfo-GMBS.**

Die Armlänge des Spacers beträgt 7,3 Å (0,73 nm), das Molekulargewicht 382,28 Dalton. Der NHS-Ester und die Maleimid-Gruppe erlauben ein kovalentes Verknüpfen von Amino- und Sulfhydryl-enthaltenden Molekülen. Erstere reagiert bei einem pH von 7-9 mit primären Aminen und bildet Amidbindungen aus, Letztere reagiert mit Sulfhydryl-Gruppen bei pH 6,5-7,5 und bildet stabile Thioether-Bindungen aus (Kitagawa *et al.*, 1981). Für die Kopplung von zunächst BSA an den Sulfo-GMBS-Linker wurden 100 mg BSA in 10 mL Konjugationspuffer gelöst und parallel 7,5 mg Sulfo-GMBS in 5 mL Konjugationspuffer. 10 mL BSA-Lösung wurden dann mit 5 mL Sulfo-GMBS-Lösung gemischt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Mischung wurde über Nacht bei 4 °C gegen Konjugationspuffer dialysiert. Für die Konjugation von Peptiden an das BSA/Linker-Konjugat wurden die zu koppelnden Peptide in Konjugationspuffer gelöst, 1 mL einer 1 mmol Peptidlösung mit 1 mL des BSA/Linker-Konjugat vermischt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde über Nacht bei 4 °C gegen Konjugationspuffer dialysiert. Nach Analyse in einem 10 % (w/v) SDS-PAA-Gel und einem indirekten Antigen-ELISA mit CRP-Peptid-spezifischen scFv wurde das Peptid/BSA-Konjugat in Selektionen von Antikörpergen-Bibliotheken eingesetzt.

#### 2.5.18 Kopplung von Antikörperfragmenten an Gold über DSP

Für die Kopplung von Antikörperkonstrukten an eine Goldoberfläche über DSP wurde die Goldoberfläche für 2 h bei Raumtemperatur mit einer 20 mM Dithiobis-(succinimidylpropionat)-Lösung (DSP) in Aceton inkubiert. Je dreimal wurde dann mit Aceton sowie H<sub>2</sub>O gespült und anschließend die Proteine auf der Goldoberfläche bei 4 °C über Nacht auf der Wippe inkubiert.

#### **2.5.19 Kopplung von Antikörperfragmenten an Gold über SAM**

Die Goldoberfläche, an der die Kopplung von Antikörperkonstrukten über einen Glutaraldehyd-SAM (*self assembled monolayer*) erfolgen sollte, wurden zuerst dreimal mit H<sub>2</sub>O gewaschen, dann mit einer 20 mM Cystamin-Lösung über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte dreimaliges Spülen mit H<sub>2</sub>O, eine zweistündige Inkubation mit 2,5 % (v/v) Glutaraldehyd und erneut dreimaliges Spülen mit H<sub>2</sub>O. Die Inkubation mit den jeweiligen Antikörpern erfolgte bei 4 °C über Nacht auf der Wippe.

#### **2.5.20 Kopplung von Antikörperfragmenten an Gold über 11-Mercaptoundecansäure**

Für die Kopplung von Antikörperfragmenten an Gold mittels 11-Mercaptoundecansäure wurde die Goldoberfläche für 48 h mit 5 mM 11-Mercaptoundecansäure in Ethanol inkubiert, anschließend wurde mit Ethanol, H<sub>2</sub>O und erneut Ethanol gespült, mit 10 mM NHS und 340 mM EDC aktiviert, und schließlich wurden die Antikörper über Nacht bei 4 °C auf der Goldoberfläche inkubiert.

#### **2.5.21 Rasterkraftmikroskopie von Goldoberflächen**

Alle Untersuchungen mit dem Rasterkraftmikroskop wurden von E. Heim (TU Braunschweig, Institut für Elektrische Messtechnik und Grundlagen der Elektrotechnik, AG Schilling) durchgeführt.

#### **2.5.22 Messung von CRP aus einer Lösung mit einer Quarzkristallmikrowaage**

Messungen von CRP durch einen CRP-spezifischen QCM Sensor wurden am Institut für Mikrotechnik der Technischen Universität Braunschweig durchgeführt. Dazu wurde ein Quarzresonator partiell auf die gewünschte Dicke nassgeätzt, um bei einer Resonanzfrequenz  $f_0$  von etwa 20 MHz zu schwingen. Der Quarzresonator wurde in ein Fließsystem integriert, welches softlithographisch aus dem Elastomer PDMS hergestellt wurde. ScFv wurden über einen selbstorganisierenden Glutaraldehyd-Monolayer (SAM) auf der Goldoberfläche des Quarzresonators im Fließsystem immobilisiert, die Sensoroberfläche wurde dann mit Casein abgesättigt. Nach Laufpufferfluss bis zu einer konstanten Basislinie wurden die Messungen bei

einer Fließgeschwindigkeit von 34  $\mu\text{L}/\text{min}$  durchgeführt. Die Messungen auf dem Sensor wurden mit einer selbstgebauten Oszillatorschaltung durchgeführt. Die Frequenz wurde mit dem Frequenzzähler gemessen und mit LabVIEW 7.0 aufgenommen. ScFv-Lösung, Laufpuffer und CRP-Lösung wurden mit einer selbstgefertigten Ventilschaltung im Wechsel über die Sensoroberfläche geleitet. Es wurden elektromagnetische 3-Wege-Ventile verwendet. Die einzelnen Lösungen wurden mit einer Schlauchpumpe über den Sensor gesaugt.

## 2.6 Zellbiologische Methoden

### 2.6.1 Kultivierung von HEK 293 T Zellen

ScFv-Fc-Fusionsproteine wurden in HEK 293T Zellen exprimiert. Diese Zellen sind humane embryonale Nierenzellen, die mit Adenoviren Typ 5 (Ad 5) transformiert wurden. HEK293T exprimieren zusätzlich das „SV40 large T-Antigen“, über das Plasmide episomal vermehrt werden können (Schein *et al.*, 1962). Das Wachstum der adhärenenten fibroblastoiden Zellen erfolgt als Monolayer. Für die Passagierung der Zellen wurde einmal vorsichtig mit PBS gewaschen, die Zellen enzymatisch mit Trypsin/EDTA von der Zellkulturschale gelöst und eine Verdünnung der abgelösten Zellen in eine neue Zellkulturschale überführt. Die Kultivierung erfolgte in DMEM *High Glucose* Medium (1 % (w/v) Pen/Strep, 8 % (v/v) FCS) bei 37 °C, 7 % CO<sub>2</sub> und einer Luftfeuchtigkeit von 100 %.

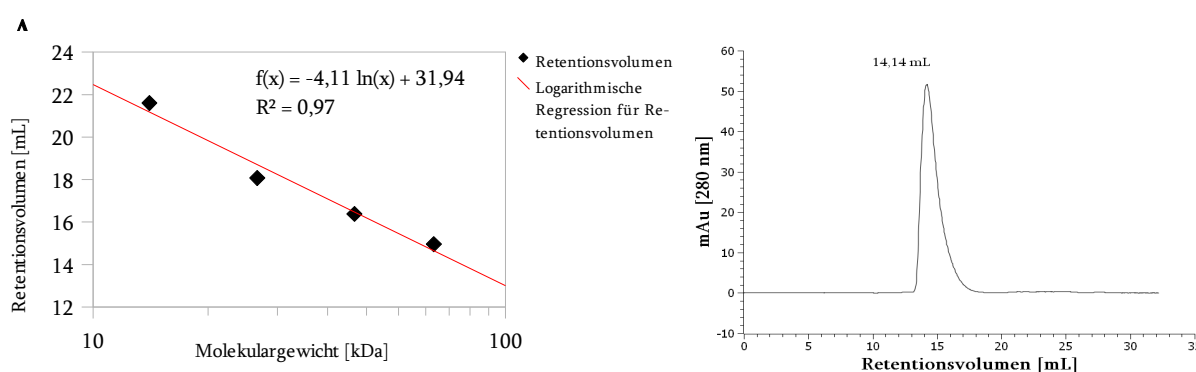
### 2.6.2 Transfektion von HEK 293 T Zellen

Für die Expression von ScFv-Fc-Fusionsproteinen in HEK 293T Zellen wurden die Zellen mit dem Transfektionsreagenz HEKfectin (BioRad) transient transfiziert.

Für die Transfektion wurden Zellen mit einer Konfluenz von 60-70 % verwendet. Die Transfektion erfolgte nach Herstellerangaben in 10 cm Zellkulturschalen oder 6-*well* Flachbodenplatten mit endotoxinfrei präparierter Plasmid-DNA. Ein Medienwechsel erfolgte nach 24 h, Proben wurden nach 48 h entnommen und für einen *Human-Capture-ELISA* verwendet oder über Protein A-Säulen aufgereinigt.

### 3.1 Gelfiltration des *Panning-Targets* C-reaktives Protein (CRP)

Um bei dem kommerziellen CRP sicherzustellen, dass es sich um das 115 kDa Pentamer handelte, wurde eine kalibrierte Größenausschlusschromatographie durchgeführt. Für die Größenausschlusschromatographie wurde eine mit PBS äquilibrierte *Superdex 200 10/300 GL* Säule an der FPLC Äkta prime verwendet. Als Referenzproteine dienten Chymotrypsin (25 kDa), Albumin (68 kDa), Ovalbumin (45 kDa) und Ribonuklease A (13,7 kDa). Anhand der hieraus abgeleiteten Regressionsgerade wurde für ein Retentionsvolumen von 14,14 mL eine molare Masse von etwa 115 kDa berechnet (Abb. 6).



**Abb. 6: Analytische Größenausschlusschromatographie zur Bestimmung der molaren Masse des CRPs.** A: Kalibrierung der *Superdex 200 10/300 GL*. Aufgetragen wurde das gemessene Elutionsvolumen gegen den dekadischen Logarithmus der Molekularmasse. Durch die Messwerte wurde eine Ausgleichsgerade gelegt, die durch lineare Regression ermittelt wurde, mit der Gleichung:  $f(x) = -4,11 \log(x) + 31,94$ . B: Elutionsprofil von CRP. Als Elutionspuffer wurde PBS verwendet, 0,5 mL einer 1 mg/mL CRP-Lösung wurden bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,5 mL/min injiziert. Das Retentionsvolumen des Elutionspeak ist mit 14,14 mL angegeben.

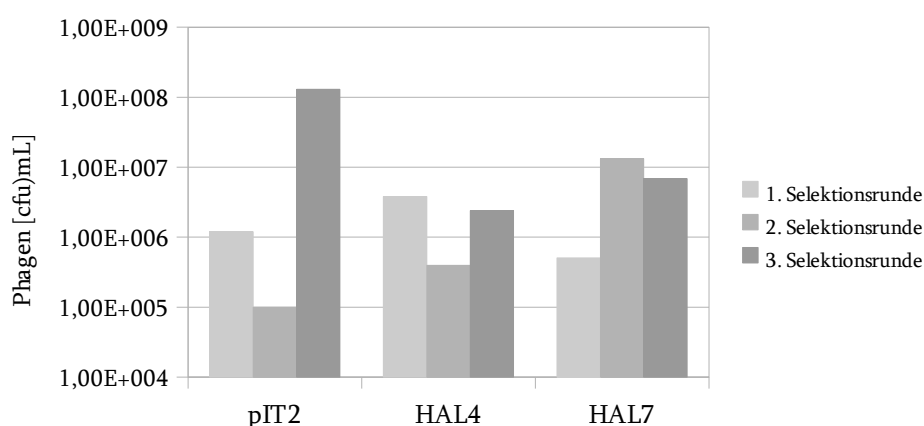
Das kommerzielle CRP war weitestgehend frei von Verunreinigungen, lag vollständig als Pentamer vor und war daher als Zielprotein zur Selektion von diagnostischen Antikörpern geeignet.

### 3.2 Selektionen von rekombinanten Antikörper-Fragmenten gegen CRP

Für die Selektion von scFv-Fragmenten gegen CRP wurden mehrere Antikörpergen-Bibliotheken verwendet. Zum Einen die humanen semisynthetischen auf dem Vektor pIT2-basierenden Antikörpergen-Bibliotheken Tomlinson I und J (Goletz *et al.*, 2002) mit randomisierten CDRs (*complementary determining regions*), zum Anderen die beiden naiven Antikörpergen-Bibliotheken HAL4 und HAL7 (Hust *et al.*, 2007), bei denen aus humanen Lymphozyten isolierte

Antikörper-Gensegmente zufällig kombiniert wurden.

Die Selektion erfolgte in den Kavitäten von Maxisorp®-*stripes*, in denen CRP adsorptiv gebunden war. Dabei wurde standardmäßig ein Präadsorptionsschritt von unspezifisch bindenden Phagen mit 2 % (w/v) MPBST/BSA in Maxisorp®-*stripes* vorangestellt. Nach Inkubation auf dem Antigen wurde stringent mit PBST unter Einsatz eines ELISA-*Washers* gewaschen. Nach der ersten Selektionsrunde wurde zehnmal gewaschen, mit jeder weiteren Runde wurden zehn Waschschrte addiert. Abschließend wurden die gebundenen Phagen enzymatisch mit Trypsin eluiert. Der Phagentiter des Eluats wurde anschließend bestimmt und die eluierten Phagen zur Reamplifikation in *E. coli* verwendet. Die Anzahl der Phagen, die in die jeweiligen Selektionsrunden eingesetzt wurden, variierte in den durchgeführten Selektionen zwischen  $1 \times 10^{11}$  und  $1 \times 10^{12}$ . In den drei Selektionen mit der Tomlinson I und J-Bibliothek, der HAL4- und der HAL7-Antikörpergen-Bibliothek variierte der Titer an eluierten Phagen. Ein leichter Abfall des Phagentiters nach der 2. Selektionsrunde trat bei den Selektionen der pIT2-basierten Tomlinson I und J Bibliotheken und der HAL4-Antikörpergen-Bibliothek auf. Die Antikörpergen-Bibliotheken wurden vor der ersten Selektionsrunde mittels „Hyperphage“ verpackt, um eine polyvalente Präsentation zu erreichen. In den folgenden Selektionsrunden wurde zur Reamplifikation der Antikörpergen-Bibliotheken der Helferphage M13K07 für monovalente Präsentation verwendet. Das Umschalten von polyvalenter zu monovalenter Präsentation führte zu diesem Titerabfall. Tendenziell stieg der Titer der aus den drei Antikörpergen-Bibliotheken selektierten Phagen von der ersten bis zur dritten Selektionsrunde meistens an (Abb. 7).



**Abb. 7: Titer der eluierten Phagen aus drei Selektionen.** Die Titer der eluierten Phagen aus den je 3 Selektionsrunden der drei verwendeten Antikörpergen-Bibliotheken pIT2 Tomlinson I und J, HAL4 und HAL7 nach der Selektion in Maxisorp®-Immuno*stripes*, an deren Oberfläche CRP gebunden war, ermittelt durch Infektion von *E. coli* XL-1 Blue MRF' sind dargestellt.

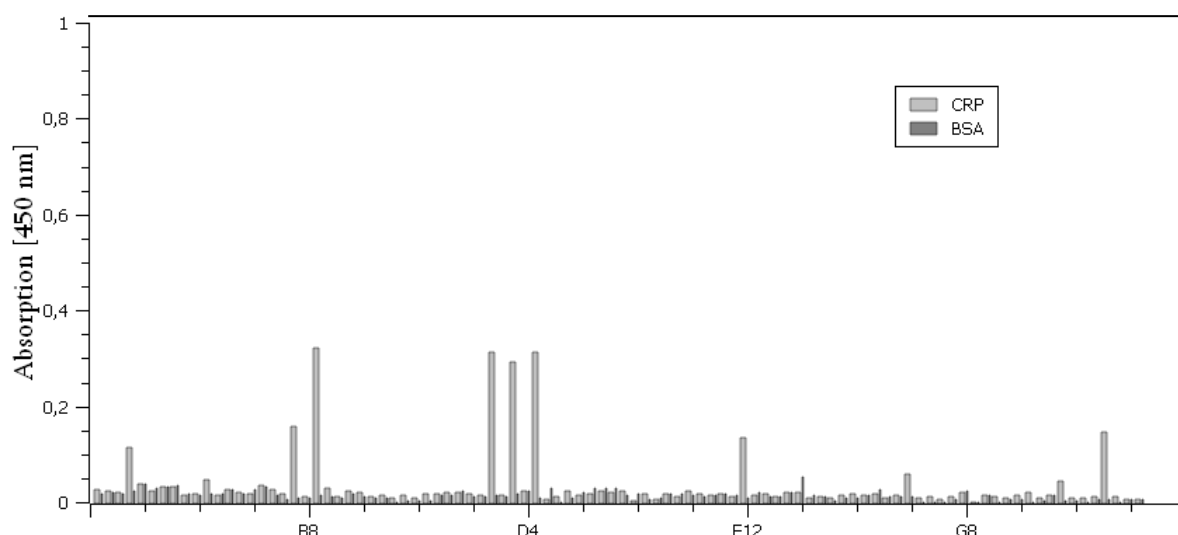
### 3.3. Analyse von Einzelklonen aus den Antikörper-Selektionen gegen CRP

#### 3.3.1 Produktion und proteinbiochemische Analyse

Um isolierte Klone aus den vorangegangenen Selektionen gegen CRP zu untersuchen, wurden Einzelkolonien, die aus den CRP-Selektionen resultierten, von Vereinzelausstrichen oder Titerausstrichen der Selektionsrunden 2 und 3 produziert und proteinbiochemisch analysiert. Das Primär-*Screening* der monoklonalen scFv-Klone erfolgte in Form eines indirekten Antigen-ELISA nach Produktion löslicher scFv aus Kulturüberständen.

Aus den Selektionen gegen CRP wurden jeweils 92 Einzelklone in Vertiefungen einer Polypropylen Mikrotiterplatte in 2 x TY-GA Medium angezogen und scFv über Nacht exprimiert. Die Expressionsüberstände wurden für einen indirekten Antigen-ELISA verwendet, der Nachweis erfolgte mit myc-Tag-spezifischen murinen IgG (9E10) und HRP-konjugierten  $\alpha$ -Maus IgG.

Acht Einzelklone aus der Selektion der pIT2-Antikörpergen-Bibliothek Tomlinson I und J gegen CRP banden im indirekten Antigen-ELISA spezifisch an CRP (Abb. 8). Weitere Einzelklone wurden aus den Selektionen der HAL4- und HAL7-Bibliotheken gegen CRP selektiert. Diese Klone wurden im Folgenden eingehender untersucht.



**Abb. 8: ELISA-Signale von Expressionsüberständen von Einzelklonen der 2. und 3. Selektionsrunde aus der pIT2-Antikörpergen-Bibliothek Tomlinson I und J im indirekten Antigen-ELISA.** Auf der Abszisse sind die Positionen und späteren Bezeichnungen der Einzelklone angegeben. Die Inkubation von Produktionsüberständen mit löslichen scFv-Protein erfolgte in Mikrotiterplatten-Vertiefungen, in denen CRP in einer 1  $\mu$ g/mL-Lösung immobilisiert wurde. Der Nachweis der CRP-spezifischen scFv erfolgte mit myc-Tag-spezifischen murinen IgG (9E10) und HRP-konjugierten Maus-spezifischen IgG. Als Negativkontrolle wurde eine mit 2 % BSA-Lösung als Antigen beschichtete Mikrotiterplatte verwendet.

### 3.3.2 Sequenz-Analyse

Nach der ersten proteinbiochemischen Untersuchung der selektierten CRP-spezifischen scFv, wurden Klone mit einem ELISA-Signal, das mindestens zehnfach über dem Hintergrund-Signal lag, sequenziert. Zuerst wurde das scFv-Gensegment über eine PCR mit den flankierenden Oligonukleotiden MHLacZ\_f und MHgIII\_r amplifiziert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Diejenigen Klone, deren Amplifikate die erwartete Größe von 1000-1100 bp hatten (Daten nicht gezeigt), wurden nach Aufreinigung sequenziert. Die Auswertung der Sequenzen hinsichtlich der Immunglobulinkeimbahnlinien erfolgte mit der VBASE2 Datenbank (Retter *et al.*, 2005). Es handelte sich bei den scFv-Klonen aus den Selektionen gegen CRP um fünf sequenzverschiedene Klone (Tab. 6). Da es sich bei der pIT2- Antikörpergen-Bibliothek Tomlinson I und J um eine semisynthetische Bibliothek handelte, lag wie zu erwarten jeweils die gleiche Antikörper-Keimbahnlinie HV3 für die schwere Kette und LV1 für die leichte Kette vor. Die CRP-spezifischen scFv aus der Antikörpergen-Bibliothek HAL7 besaßen schwere Ketten aus den Subfamilien HV1 und HV6, die leichten Ketten entstammten ausschließlich dem Lambda-Repertoire, wobei die Subfamilien LV1 und LV2 vertreten waren.

Klon	Antikörpergen-Bibliothek	VH Gensegment (nach IMGT)	VL Gensegment (nach IMGT)
LA13-IID4	pIT2	IGHV3-23*01 IGHJ4*02	IGKV1D-39*01 IGKJ1*01
LA13-IIC3	pIT2	IGHV3-23*01 IGHJ4*02	IGKV1D-39*01 IGKJ1*01
LA13-IIE3	pIT2	IGHV3-23*01 IGHJ4*02	IGKV1D-39*01 IGKJ1*01
TOB4-B11	HAL7	IGHV1-69*01 IGHD3-10*01 IGHJ5*02	IGLV1-44*01 IGLJ3*01
TOB5-D4	HAL7	IGHV6-1*01 IGHD2-8*01 IGHJ3*02	IGLV2-8*03 IGLJ3*01

**Tab. 6: Auflistung der aus den Selektionen resultierenden CRP-spezifischen scFv.** Angegeben ist die verwendete Antikörpergen-Bibliothek, sowie die über die VBASE2 Datenbank ermittelten Keimbahnlinien nach IMGT.



### 3.4 Produktion CRP-spezifischer scFv-Fragmente in *E. coli*

#### 3.4.1 Klonierung der scFv-Genfragmente in den Vektor pOPE101 für die Expression von scFv-Proteinen in *E. coli* XL-1 Blue MRF'

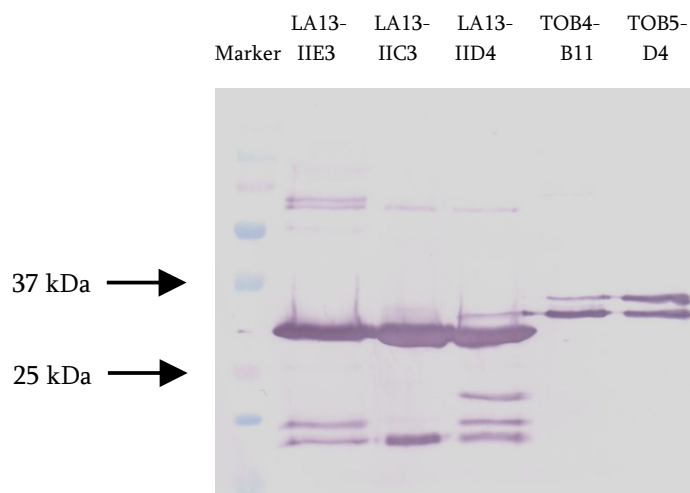
Da für weitergehende Charakterisierungen CRP-spezifische scFv in größeren Mengen produziert werden mussten, wurden die scFv-Genfragmente in den *E. coli* Expressionsvektor pOPE101 kloniert. Hierzu wurden die korrespondierenden scFv-Gene mittels der Restriktionsschnittstellen *NcoI* und *NotI* in den Zielvektor pOPE101-XP (siehe Anhang) subkloniert. Nach Transformation von *E. coli* XL-1 Blue MRF' Zellen wurde der Erfolg der Subklonierung über eine Kolonie-PCR überprüft.

#### 3.4.2 Expression und Aufreinigung CRP-spezifischer scFv in *E. coli* XL-1 Blue MRF'

Die Produktion CRP-spezifischer scFv erfolgte in 300 mL 2 x TY-Medium mit Ampicillin und Glukose in 1 L-Schüttelkolben. Nach 20 Stunden Inkubation wurden die Zellen durch Zentrifugation sedimentiert, scFv aus dem Überstand und dem Periplasma wurden präpariert und über Nacht bei 4 °C unter Rühren gegen PBS dialysiert. Die Aufreinigung erfolgte über den HIS-Tag der scFv mit Nickel-komplexierter *Chelating Sepharose<sup>TM</sup> Fast Flow Matrix* über IMAC. Es wurde dreimal mit dem zweifachen Matrixvolumen PBS mit 0,1 M EDTA eluiert. Die Elutionsfraktionen wurden über Nacht bei 4 °C gegen PBS dialysiert und bei -20 °C ohne Schutzprotein gelagert. Nach Auftrennung der produzierten CRP-spezifischen scFv in einem 12 %igen SDS-PAA-Gel und anschließendem Transfer auf eine PVDF-Membran wurden die elektrophoretisch aufgetrennten scFv spezifisch mit dem murinen myc-Tag-spezifischen IgG 9E10 angefärbt. Die molekulare Masse der produzierten scFv auf der PVDF-Membran lag im Bereich der theoretischen molekularen Masse der scFv von etwa 30 kDa (Abb. 9). Die CRP-spezifischen scFv, die aus der Tomlinson I und J Antikörpergen-Bibliothek stammten, besaßen die gleiche Masse, da sie dasselbe Gerüst und keine unterschiedlich langen CDRs aufweisen. Die Klone, die aus der HAL7-Antikörpergen-Bibliothek stammten, waren aus unterschiedlichen Gensegmenten des Lambda-Repertoires aufgebaut, insbesondere die CDR3 besaßen daher unterschiedliche Größen.

Nach Lagerung der aufgereinigten CRP-spezifischen scFv ohne Schutzprotein für ca. 1,5 Jahre bei -20 °C wurden neben Banden bei ca. 30 kDa durch proteolytischen Abbau Doppelbanden und

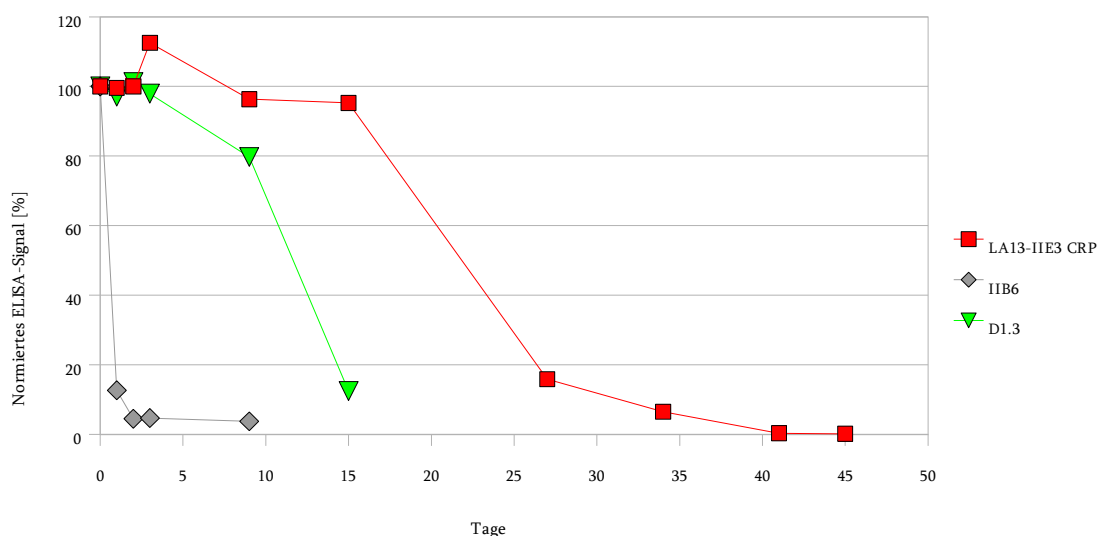
Banden geringerer molekularer Massen sichtbar (Abb. 9).



**Abb. 9: Immunfärbung eines Western-Blots nach gelelektrophoretischer Auftrennung CRP-spezifischer scFv in einem 12 %igen SDS-PAA-Gel.** Nach His-Tag-Aufreinigung der CRP-spezifischen scFv LA13-IIE3, LA13-IIC3, LA13-IID4, TOB4-B11 und TOB5-D4 aus Periplasma und Kulturüberstand wurden diese in einem 12 %igen SDS-PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt, über Western-Blot auf PVDF-Membran transferiert und immunologisch angefärbt. Der Nachweis erfolgte mit myc-Tag-spezifischen murinen IgG und AP-konjugierten Maus-spezifischen IgG.

### 3.5 Stabilitätsanalyse CRP-spezifischer scFv

ScFv, die in ein regenerierbares Massensensorsystem integriert werden sollen, müssen eine hohe Stabilität aufweisen, um eine längere Lagerung bei Raumtemperatur ohne Funktionsverlust überstehen zu können. Um die Stabilität der im Rahmen dieser Arbeit generierten CRP-spezifischen scFv zu untersuchen, wurde der CRP-spezifische scFv LA13-IIE3, sowie parallel der Lysozym-spezifische scFv D1.3 und der Mucin 1-spezifische scFv IIB6 für verschiedene Zeiträume bei 37 °C gelagert. Die Aktivität wurde im Vergleich zu Proben, die bei – 20 °C gelagert wurden, im indirekten Antigen-ELISA bestimmt (Abb. 10). Der Nachweis erfolgte mit dem myc-Tag-spezifischen murinen IgG 9E10 und einem Maus-spezifischen, HRP-konjugierten IgG. Der CRP-spezifische scFv LA13-IIE3 begann erst nach 15 Tagen Inkubation bei 37 °C seine spezifische Aktivität zu verlieren, während der Mucin 1-spezifische scFv IIB6 bereits nach 2 Tagen Inkubation seine Antigenbindungsfähigkeit vollständig verlor. Die Bindung von D1.3 an Lysozym fiel ab Tag 10 stark ab. Keiner der scFv-Klone zeigte eine unspezifische Bindung an BSA (Daten nicht gezeigt). Der CRP-spezifische scFv LA13-IIE3 eignete sich also für die Integration in ein Massensensorsystem, da er für mindestens 2 Wochen bei Raumtemperatur gelagert werden konnte, ohne CRP-Spezifität und -bindungsvermögen zu verlieren.



**Abb. 10: Stabilitätstest unterschiedlich lang gelagerter CRP-spezifischer scFv im indirekten Antigen-ELISA.** Jeweils 1 µg/mL CRP oder Lysozym, bzw. 500 ng/mL Mucin 1-Peptid wurden in den Kavitäten von Mikrotiterplatten adsorptiv gebunden. Der CRP-spezifische scFv LA13-IIE3, der Lysozym-spezifische scFv D1.3 und der Mucin 1-spezifische scFv IIB6 wurden für unterschiedliche Zeiträume bei 37 °C gelagert. Diese Proben wurden auf dem entsprechenden Antigen inkubiert. Parallel wurde der Ansatz auf BSA als Kontrolle für die Spezifität der Bindung (nicht gezeigt) mitgeführt. Der Nachweis der Bindeaktivität erfolgte mit dem myc-Tag-spezifischen murinen IgG und HRP-konjugierten Maus-spezifischen IgG. Die Absorptionssignale des ELISAs wurden für eine bessere Vergleichbarkeit auf die bei -20 °C gelagerten Proben normiert.

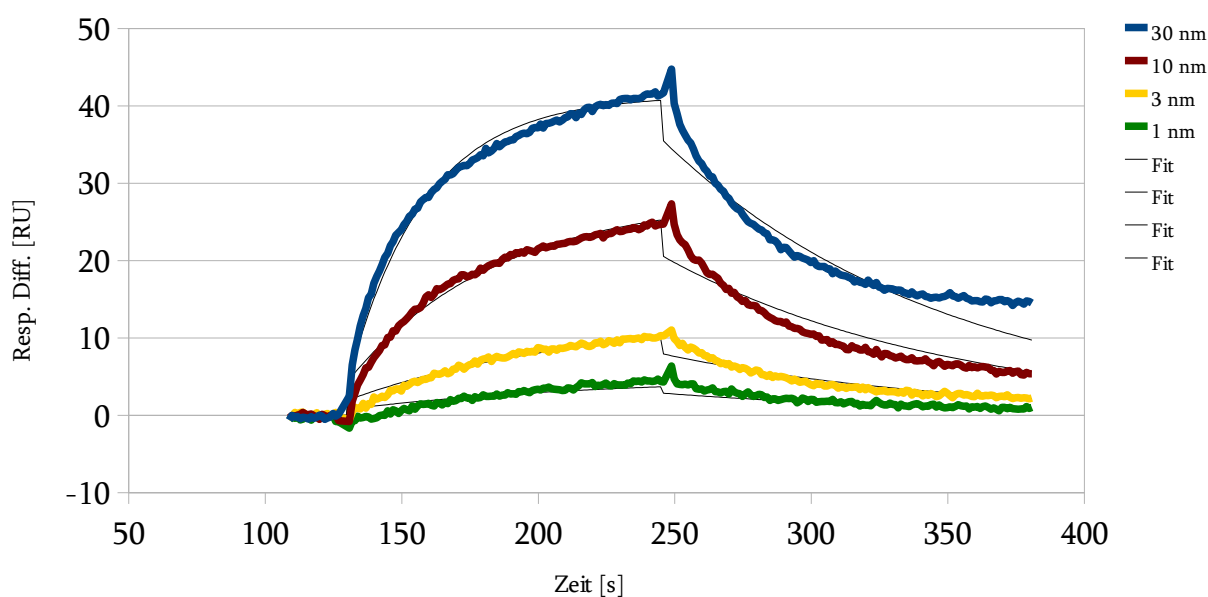
### 3.6 Bestimmung der Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) CRP-spezifischer scFv mittels Oberflächenplasmonresonanz

Für weitergehende Charakterisierungen der generierten CRP-spezifischen scFv hinsichtlich ihrer Anwendbarkeit auf einem Massensensorsystem wurde die Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) über Oberflächenplasmonresonanz (SPR; *surface plasmon resonance*) im BIAcore2000 System bestimmt.

Dazu wurde ein dextranbeschichteter BIAcore CM5-Chip mittels Aminokopplung kovalent mit CRP beladen. Die Kopplung von CRP an den Chip erfolgte mit 10 mM Natriumacetat, pH 5,0 und einer 2,5 µg/mL CRP-Lösung. Als Laufpuffer für die getesteten scFv-Fragmente wurde PBS verwendet und der Chip mit 50 mM NaOH regeneriert. Die Fließgeschwindigkeit betrug 30 µL/min. Die Probe wurde in einem Volumen von insgesamt 50 µL injiziert. Als Negativkontrolle erfolgte ein Fluß der Analyten über Lysozym. Die Oberflächenplasmonresonanz-Messungen CRP-spezifischer Antikörper wurde mit 1 nM, 3 nM,

10 nM, 30 nM und 100 nM scFv in Doppelbestimmungen durchgeführt (Abb. 11, dargestellt sind Einzelmessungen), die Auswertung der aufgenommenen Daten und die Berechnung der Kinetiken erfolgte mit der Evaluationssoftware „BIAevaluation 4.1“. Bei den angegebenen Daten und Graphen wurde das Negativsignal, d. h. die Bindung an Lysozym, von der Auswertungssoftware subtrahiert. Dem Verlauf der *fitting*-Kurven entsprechend wurden Assoziation und Dissoziation von der Auswertungssoftware nach dem Bindemodell 1:1-Langmuir berechnet. Da die *fitting*-Kurvenverläufe nicht mit den tatsächlichen Kurvenverläufen übereinstimmten, konnte hier nur von einer Näherung ausgegangen werden. Die tatsächlichen Kurvenverläufe zeigten eine weniger steile Dissoziation als die *fitting*-Kurven an. Diese fehlenden Übereinstimmungen konnten durch sog. *Bulk*-Effekte, also teilweise Dimerisierung oder Aggregation von scFv oder undefiniertem Material, verursacht worden sein.

Somit ist es wahrscheinlich, dass die in Tab. 7 angegebenen Assoziations- und Dissoziationskonstanten noch in einen Bereich höher affiner scFv korrigiert werden können.



**Abb. 11: Sensorgramme als Overlay-Plot des CRP-spezifischen scFv LA13-IIIE3.** Abgebildet sind die Sensorgramme des CRP-spezifischen scFv LA13-IIIE3 in verschiedenen Molaritäten unter Verwendung eines CM5-Chips, an den über Aminokopplung CRP kovalent gebunden ist. Die *fitting*-Kurven, welche den mathematischen Modellen zugrunde lagen, sind als dünne schwarze Linien dargestellt.

Klon	$K_A$ (1/M)	$K_D$ (M)
LA13-IIE3	$9,02 \times 10^7$	$1,11 \times 10^{-8}$
LA13-IID4	$6,27 \times 10^7$	$1,6 \times 10^{-8}$
LA13-IIC3	$3,77 \times 10^7$	$2,66 \times 10^{-8}$

Tab. 7: Assoziations- und Dissoziationskonstanten CRP-spezifischer scFv.

### 3.7 Oberflächenplasmonresonanzanalyse CRP-spezifischer scFv mit unterschiedlichen Epitopen

Abschließend wurde mit den drei CRP-spezifischen scFv LA13-IIE3, LA13-IID4 und LA13-IIC3 eine Epitop-Bestimmung vorgenommen. Diese wurde zuerst mittels Oberflächenplasmonresonanz-Messungen durchgeführt. CRP wurde kovalent an einen CM5-Chip gekoppelt und nach Injektion von Protein eines scFv-Klons nach Erreichen des Sättigungsbereichs wurde Protein eines zweiten scFv-Klons injiziert. Aus der Kurve konnte ermittelt werden, ob beide scFv-Klone dasselbe oder verschiedene CRP-Epitope erkennen. Die Versuche wurden dabei auch in umgekehrter Injektionsreihenfolge durchgeführt. Puffer diente anstelle von scFv 1 oder scFv 2 als zusätzliche Kontrolle (Tab. 8).

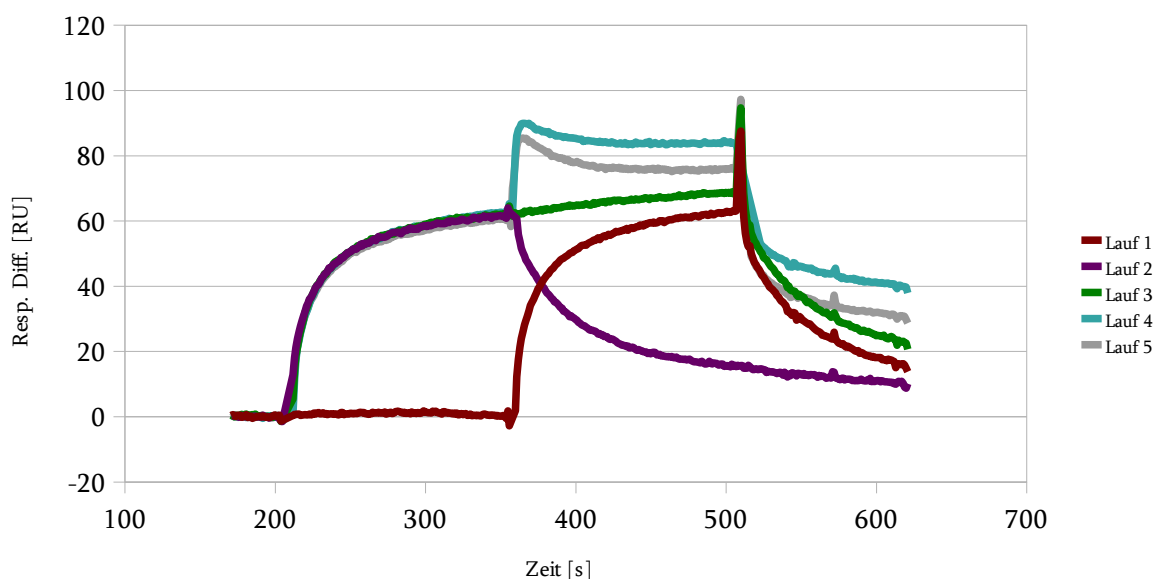
Lauf	Injektion 1	Injektion 2	Lauf	Injektion 1	Injektion 2	Lauf	Injektion 1	Injektion 2
1	PBS	LA13-IIE3	6	PBS	LA13-IIC3	11	PBS	LA13-IID4
2	LA13-IIE3	PBS	7	LA13-IIC3	PBS	12	LA13-IID4	PBS
3	LA13-IIE3	LA13-IIE3	8	LA13-IIC3	LA13-IIC3	13	LA13-IID4	LA13-IID4
4	LA13-IIE3	LA13-IIC3	9	LA13-IIC3	LA13-IIE3	14	LA13-IID4	LA13-IIC3
5	LA13-IIE3	LA13-IID4	10	LA13-IIC3	LA13-IID4	15	LA13-IID4	LA13-IIE3

Tab. 8: Kombinationen zwischen verschiedenen CRP-spezifischen scFv und Puffern, die für die Epitop-Bestimmung jener scFv auf dem CM5-Chip koinjiziert wurden.

Erwartet wurden folgende Kurvenverläufe: wenn Antikörper 1 Epitop 1 auf dem Antigen erkannte, führte dies zu einer Massenzunahme und einem Anstieg der Resonanz im Sensorgramm. Erkannte nun Antikörper 2 ein zweites, anderes Epitop auf demselben Antigen, so kam es nach dessen Injektion zu einer weiteren Massenzunahme, da hier noch freie Bindungsstellen vorlagen. Falls beide Antikörper dasselbe Epitop erkannten, kam es nach Injektion von Antikörper 2 zu

keiner weiteren Massenzunahme, da diese Epitope schon abgesättigt waren.

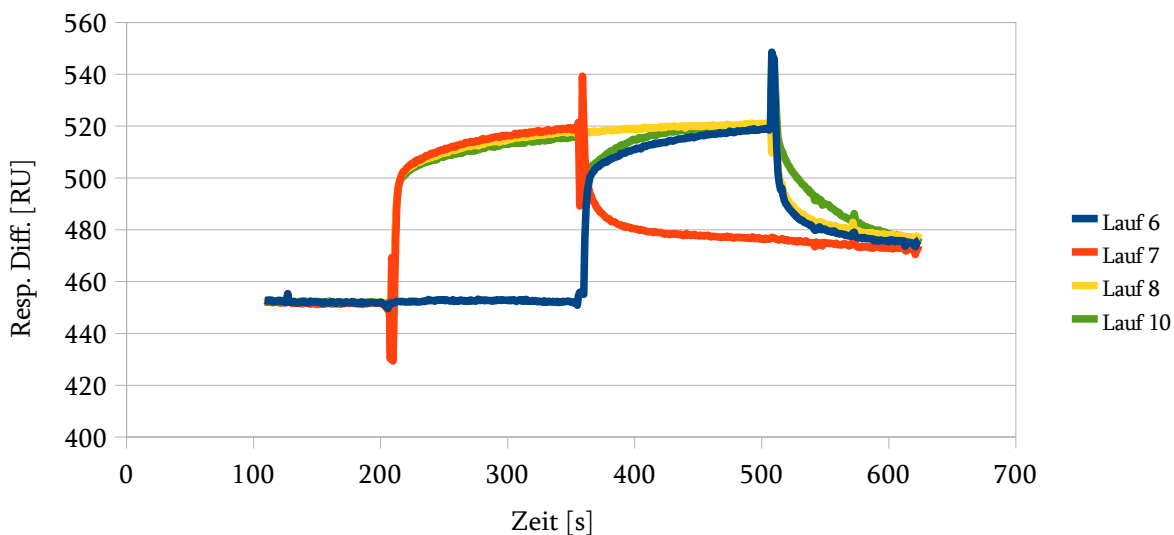
Die Injektion eines scFv mit nachfolgendem PBS-Pufferfluss (Abb. 12, 13 und 14: Läufe 1, 6 und 11, sowie 2, 7 und 12) zeigte den Resonanzverlauf einzelner scFv mit ihrer charakteristischen Assoziations- und Dissoziationskinetik. Bei der Injektion von LA13-IIE3 und unmittelbar folgender Injektion von LA13-IID4/LA13-IIC3 (Abb. 12, Läufe 4 und 5) stieg das Resonanzsignal nach der Injektion des 2. scFv trotz Sättigung durch den 1. scFv erneut an.



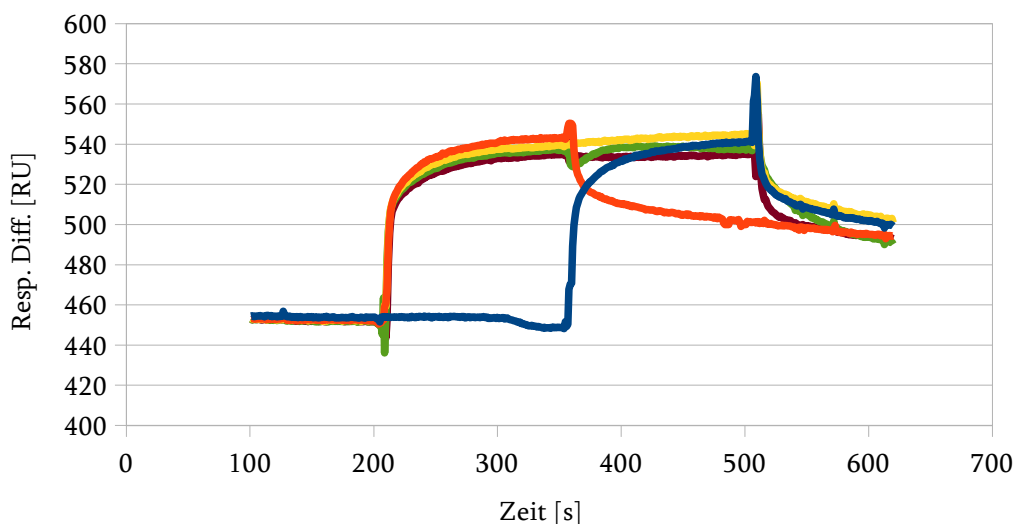
**Abb. 12: Overlay-Plot der Sensorgramme der Epitop-Bestimmung von LA13-IIE3, LA13-IID4 und LA13-IIC3 auf CRP.** Nach Injektion des scFv LA13-IIE3 (Lauf 2) sieht man hier Dissoziation und Assoziation des Antikörperfragments auf dem Liganden CRP. Erfolgte eine zweite Injektion mit LA13-IIC3 (Lauf 4), bzw. LA13-IID4 (Lauf 5), kam es zu einer weiteren Masseerhöhung durch Bindung an weitere Bindestellen auf dem Liganden CRP. Als Negativkontrolle wurde LA13-IIE3 (Lauf 3) weiter injiziert, eine zweite Negativkontrolle erfolgte mit Injektion von PBS und LA13-IIE3 (Lauf 1).

Interessanterweise kam es nach Injektion in umgekehrter Reihenfolge von LA13-IIC3 → LA13-IIE3, sowie LA13-IID4 → LA13-IIE3 (Abb. 13 und 14, Lauf 9 (nicht gezeigt) und Lauf 15) zu keinem weiteren Masseanstieg bei der 2. Injektion. Um auszuschließen, dass eine hohe *Offrate* Ursache für die fehlende Massezunahme war, wurde nach der ersten Injektion von LA13-IIE3, LA13-IIC3 oder LA13-IID4, diese scFv weiter injiziert (Abb. 12-14, Läufe 3, 8 und 13). Trotzdem kam es zu keinem weiteren Anstieg. Die Injektion von LA13-IIC3 → LA13-IID4 (Lauf 10), sowie LA13-IID4 (1. Injektion) → LA13-IIC3 (2. Injektion) (Lauf 14) führte in beiden Reihenfolgen zu keinem Resonanzanstieg, also keiner Bindung des 2. injizierten scFv an das Antigen. Der CRP-spezifische scFv LA13-IIE3 erkannte ein anderes Epitop als der scFv LA13-IIC3, bzw. als der scFv

LA13-IID4, wenn LA13-IIE3 zuerst und LA13-IIC3, bzw. LA13-IID4 als zweiter scFv injiziert wurde. Bei Injektionen in umgekehrter Reihenfolge kam es zu keiner Erkennung des Epitopes durch den scFv-Klon LA13-IIE3.



**Abb. 13: Overlay-Plot der Sensorgramme der Epitop-Bestimmung von LA13-IIE3, LA13-IID4 und LA13-IIC3 auf CRP.** Nach Injektion des scFv LA13-IIC3 (Lauf 7) sieht man hier Dissoziation und Assoziation des Antikörperfragments auf dem Liganden CRP. Erfolgte eine zweite Injektion mit LA13-IID4 (Lauf 10), so kam es zu keiner weiteren Masseerhöhung, also keiner Bindung an weitere Bindestellen auf dem Liganden CRP. Als Negativkontrolle wurde LA13-IIC3 (Lauf 8) weiter injiziert, eine zweite Negativkontrolle erfolgte mit Injektion von PBS und LA13-IIE3 (Lauf 6).

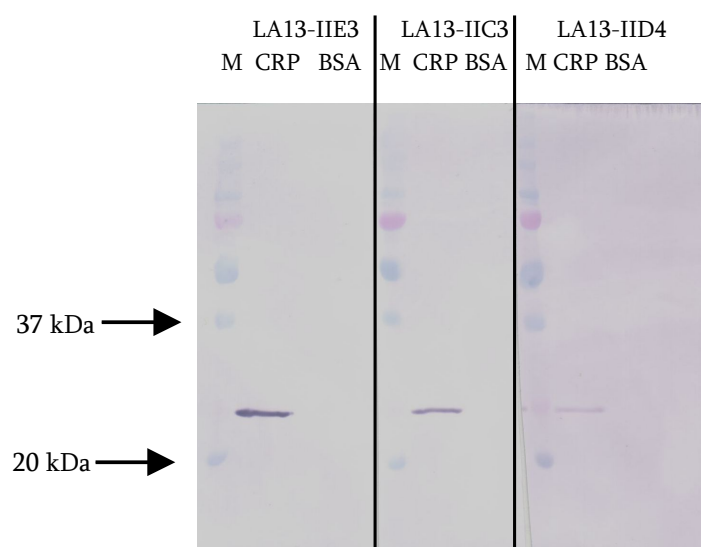


**Abb. 14: Overlay-Plot der Sensorgramme der Epitop-Bestimmung von LA13-IIE3, LA13-IID4 und LA13-IIC3 auf CRP.** Nach Injektion des scFv LA13-IID4 (Lauf 12) sieht man hier Dissoziation und Assoziation des Antikörperfragments auf dem Liganden CRP. Erfolgte eine zweite Injektion mit LA13-IIC3 (Lauf 14), bzw. LA13-IIE3 (Lauf 15), so kam es zu keiner weiteren Masseerhöhung, also keiner Bindung an weitere Bindestellen auf dem Liganden CRP. Als Negativkontrolle wurde LA13-IID4 (Lauf 13) weiter injiziert, eine zweite Negativkontrolle erfolgte mit Injektion von PBS und LA13-IIE3 (Lauf 11).

### 3.8 Epitop-Bestimmung CRP-spezifischer scFv mit Peptidmembranen

Antikörper, die lineare Epitope erkennen, können für eine Epitop-Bestimmung mittels Peptidmembranen eingesetzt werden, wobei Peptide auf modifizierten Whatman-Filterpapieren synthetisiert wurden (mündliche Aussage U. Beutling, HZI).

Um zu testen, ob die scFv-Klone lineare Epitope erkennen, wurde ein Immunoblot durchgeführt, in dem CRP zuvor über eine reduzierende SDS-PAGE unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt wurde. CRP konnte mittels reduzierender SDS-PAGE mit anschließendem Immunoblot mit den scFv LA13-IIE3, LA13-IID4 und LA13-IIC3 nachgewiesen werden, d. h. die drei scFv erkannten ein lineares Epitop (Abb. 15) im Gegensatz zu TOB4-B11 und TOB5-D4 (Daten nicht gezeigt).



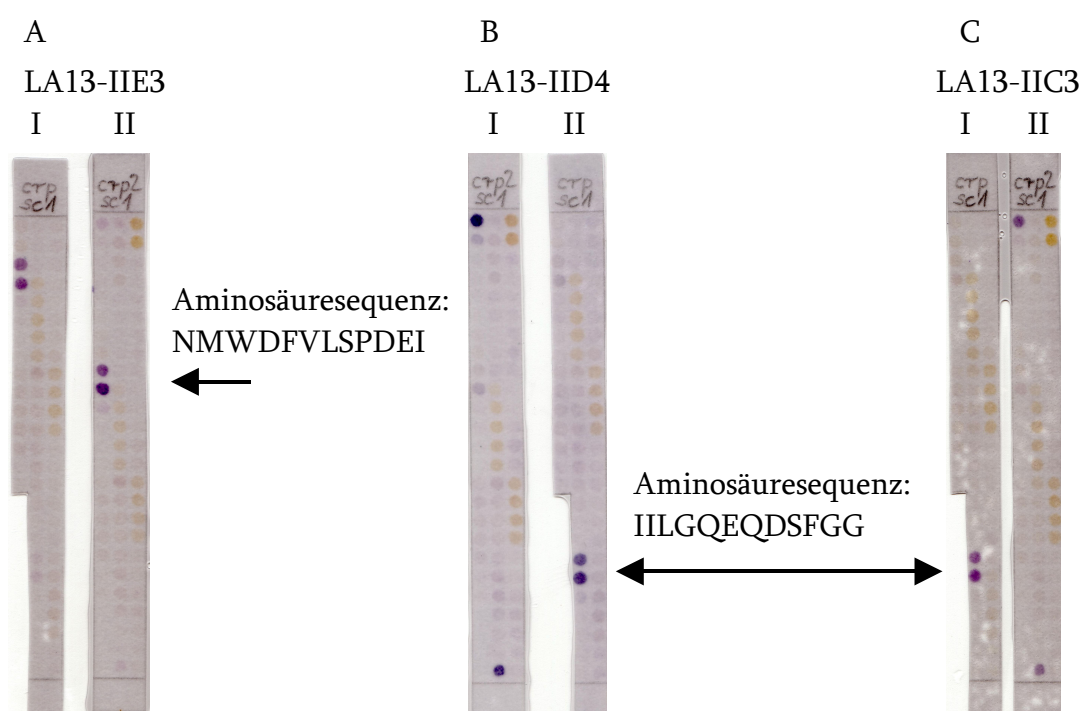
**Abb. 15: Nachweis der CRP-Bindung durch die scFv LA13-IIE3, LA13-IIC3 und LA13-IID4.** 150 ng/Laufbande CRP wurden in einem 12 % (w/v) SDS-PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt; die aufgetrennten Proteine wurden auf PVDF-Membran mittels Western-Blot transferiert und angefärbt. Die Färbung erfolgte mit CRP-spezifischen scFv (LA13-IIE3, LA13-IID4 oder LA13-IIC3), myc-Tag-spezifischen murinen IgG und AP-konjugierten Maus-spezifischen IgG.

Das CRP-Protein wurde als Serie sich um 3 Aminosäuren-überlappender Peptidsequenzen (15-mere) auf modifizierten Whatman-Filterpapieren über Aminokopplung synthetisiert (HZI, Abteilung Chemische Biologie). Auf diese Weise konnten die CRP-Epitope genau bestimmt werden, welche die scFv LA13-IIE3, LA13-IID4 und LA13-IIC3 erkannten. Nach Inkubation der einzelnen CRP-spezifischen scFv LA13-IIE3, LA13-IID4 oder LA13-IIC3 auf den Filtern wurden



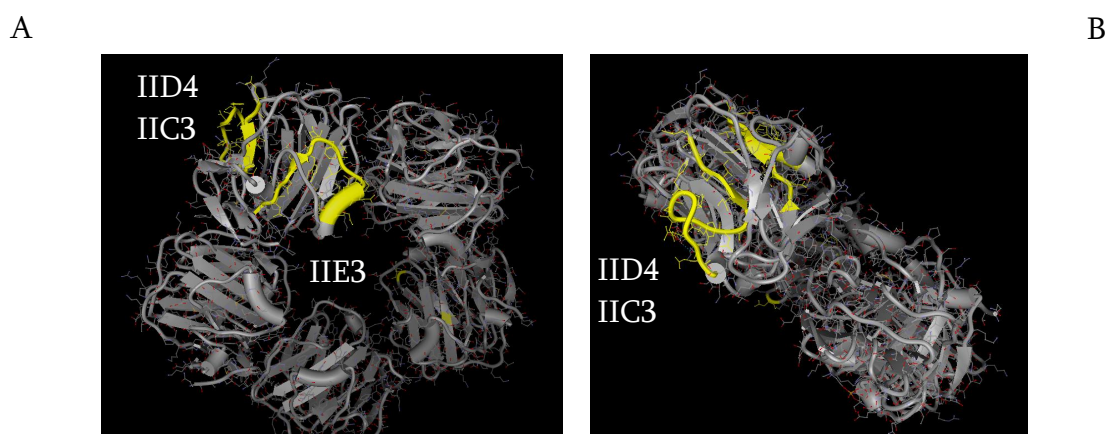
die gebundenen scFv mittels myc-Tag-spezifischen murinen IgG und AP-konjugierten Maus-spezifischen IgG nachgewiesen. Als Negativkontrolle wurden die Filterpapiere nur mit den Nachweisantikörpern behandelt, wobei keine Peptid-*Spots* angefärbt wurden (Daten nicht gezeigt), und unspezifische Färbungen bei den späteren Analysen der CRP-spezifischen scFv ausgeschlossen werden konnten.

Nach Inkubation von LA13-IIE3, LA13-IID4 und LA13-IIC3 auf den Filterpapieren, erkannte LA13-IIE3 das CRP-Epitop NMWDFVLSPDEI, die scFv LA13-IID4 und LA13-IIC3 das CRP-Epitop IILGQEQDSFGG (Abb. 16, A, B und C).



**Abb. 16: Epitop-Bestimmung CRP-spezifischer scFv auf Peptid-*Spots* der humanen CRP-Aminosäuresequenz.** Die humane CRP-Aminosäuresequenz wurde als Serie sich überlappender 15mer Oligopeptide an Whatman Filterpapiere synthetisiert und mit CRP-spezifischen scFv angefärbt. Die Peptidsequenz der angefärbten Bereiche können einer Tabelle (siehe Anhang) entnommen werden. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen (I und II) durchgeführt. A: Anfärbung der erkannten Peptidspots durch LA13-IIE3. B und C: Mit LA13-IID4 und mit LA13-IIC3 angefärbte Peptidspots auf Whatman-Filterpapier. Der Nachweis erfolgte Maus  $\alpha$ -myc-Tag IgG und AP-konjugierten Maus-spezifischen IgG.

Das Epitop der CRP-spezifischen scFv LA13-IIC3 und LA13-IID4 befindet sich in der Peripherie des CRP-Moleküls und ist partiell aus einer  $\beta$ -Faltblatt-Struktur aufgebaut. Das Epitop des scFv LA13-IIE3 befindet sich nahe der zentralen Pore des Moleküls und enthält eine  $\alpha$ -Helix-Struktur (Abb. 17, A und B)



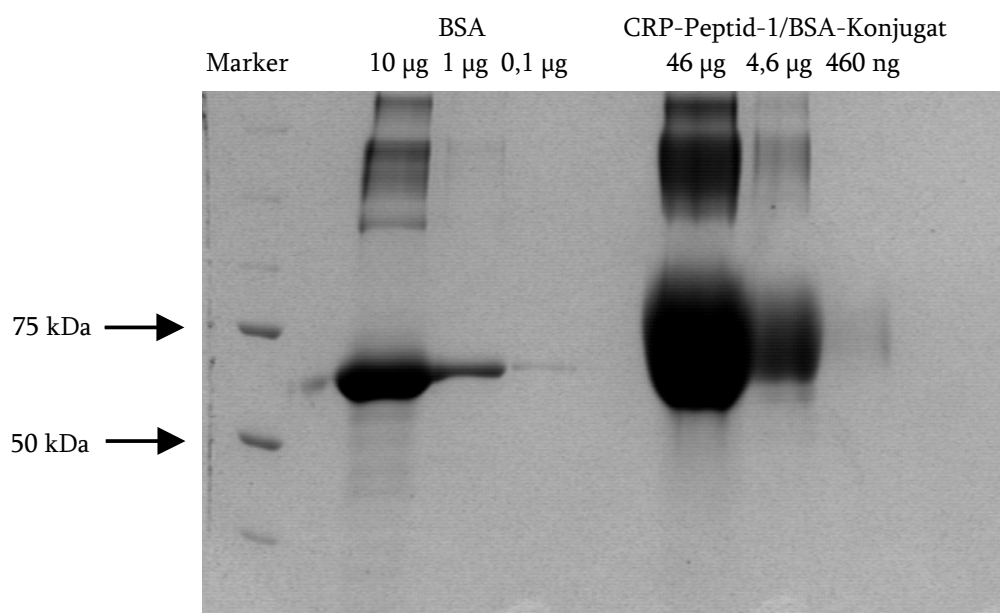
**Abb. 17: Dreidimensionale schematische Darstellung des CRP-Pentamers mit Epitopen von CRP-spezifischen scFv.** Dargestellt sind  $\beta$ -Faltblätter und  $\alpha$ -Helices als Sekundärstrukturen im CRP-Molekül. Gelb hervorgehoben ist die in der Epitop-Bestimmung ermittelte Bindestelle NMWDFVLSPDEI für den scFv LA13-IIE3 (A), sowie IILGQEQDSFGG für die scFv LA13-IID4 und LA13-IIC3 (B) (Quelle: 3D-Mol Viewer, Vector NTI 10.0.1).

### 3.9 Kopplung von CRP-Peptiden an BSA

Die zuvor ermittelten Peptid-Epitope wurden zu einer erneuten Selektion von scFv aus Antikörpergen-Bibliotheken genutzt, um epitopspezifische scFv zu erhalten, welche in unterschiedlichen Modulen eines Massensensorsystems eingesetzt werden können. Um Selektionen aus Antikörpergen-Bibliotheken gegen Peptide durchzuführen, mussten diese an Oberflächen immobilisiert werden. Dazu wurden sie an *carrier*-Proteine, hier BSA, gekoppelt, welche deren adsorptive Immobilisierung an Mikrotiterplatten-Plastikoberflächen begünstigen.

Für die Kopplung von Oligopeptiden an BSA wurde der heterobifunktionale Crosslinker Sulfo-GMBS verwendet. Bei dem verwendeten Peptid handelte es sich um CRP-Peptid-1 (CEASIILGQEQDSFGGNFE-amid), welches das Epitop der CRP-spezifischen scFv LA13-IID4 und LA13-IIC3 enthält. Die Kontrolle des an BSA gekoppelten Peptides erfolgte gelelektrophoretisch in einem 7,5 %igen PAA-Gel (Abb. 18) und in einem indirekten Antigen-ELISA mit dem Nachweisantikörper LA13-IIE3 (Abb. 19). Pro BSA-Molekül konnte eine unterschiedliche Menge

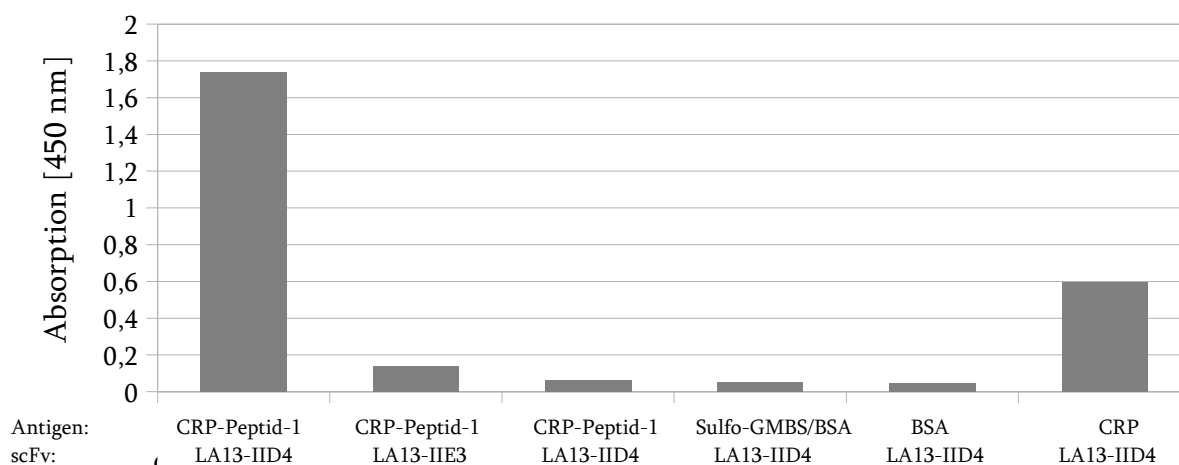
CRP-Peptid-1-Moleküle gekoppelt werden. Dies führte nach der gelelektrophoretischen Auftrennung zu einem Schmier im SDS-PAA-Gel, während ungekoppeltes BSA im Vergleich als scharfe Bande erschien.



**Abb. 18: Coomassie-gefärbtes PAA-Gel mit verschiedenen Konzentrationen von BSA und CRP-Peptid-BSA-Konjugaten.** Unterschiedliche Konzentrationen BSA und CRP-Peptid-BSA-Konjugat wurden gelelektrophoretisch in einem 7,5 %igen SDS-PAA-Gel aufgetrennt. Die zur Kopplung an den Linker verwendete Fraktion V des bovinen Albumins enthält noch weitere Bestandteile, diese Verunreinigungen erscheinen als zusätzlicher Schmier auf dem gefärbten Gel und betragen < 10 % des Gesamtproteins.

Der Nachweis der erfolgreichen BSA-CRP-Peptid-Kopplung erfolgte mit einem indirekten ELISA mit dem CRP-Peptid-spezifischen scFv LA13-IID4, als Negativkontrollen wurden zum einen die scFv LA13-IIE3 mit einer Spezifität für CRP-Peptid-2 (NMWDFVLSPDEI) verwendet, zum Anderen wurde LA13-IID4 auf Bindung an BSA, sowie an Sulfo-GMBS/BSA-Konjugat getestet (Abb. 19).

Der Erfolg der Kopplung von CRP-Peptid-1 an BSA wurde mittels indirekten Antigen-ELISA gezeigt. Inkubation von LA13-IID4 auf dem CRP-Peptid-1/BSA-Konjugat führte zu einem ELISA-Signal, es erfolgte jedoch keine Bindung an das Linker/BSA-Konjugat oder an das CRP-Peptid-2 mit der Sequenz NMWDFVLSPDEI. Das CRP-Peptid-2 besaß eine nur geringe Löslichkeit in Wasser und wurde daher nicht für weitere Selektionen verwendet.



**Abb. 19: Indirekter Antigen-ELISA mit dem CRP-spezifischen scFv LA13-IID4.** Neben der Bindung auf das BSA-konjugierte CRP-Peptid-1 wurden weitere CRP-spezifische Antikörper, die eine andere Aminosäuresequenz als die von CRP-Peptid-1 erkennen, auf Bindung an dieses Peptid untersucht. Weitere Negativkontrollen erfolgten mit LA13-IID4 auf CRP-Peptid-2, Sulfo-GMBS/BSA-Konjugat und BSA. Der Nachweis erfolgte mit myc-Tag-spezifischen murinen IgG und HRP-konjugierten Maus-spezifischen IgG.

### 3.10 Selektion von Antikörpern gegen CRP-Peptid-Epitope

Für die Selektion von scFv, die gegen die in 3.8 ermittelte Aminosäuresequenz IILGQEQDSFGG, gerichtet sind, wurden die humanen naiven auf dem Vektor pHAL14-basierende Antikörpergen-Bibliotheken HAL4 und HAL7 (Hust *et al.*, 2007) verwendet.

Die Selektion erfolgte mit BSA-konjugiertem Peptid, das an die Kavitäten von Polystyrol-Immunostripes adsorbiert war. Eine Präadsorption von Phagen, die den Linker oder nicht spezifisch banden, wurde vor der eigentlichen Selektion durchgeführt. Nach der Inkubation auf dem CRP-Peptid-1/BSA-Konjugat wurde stringent mit PBST unter Verwendung eines ELISA-Washers gewaschen. Nach der ersten Selektionsrunde wurde zehnmal gewaschen, mit jeder weiteren Runde wurden zusätzlich zehn weitere Waschschrte durchgeführt.

Abschließend wurden die gebundenen Phagen mit Trypsin eluiert. Der Phagentiter des Eluats wurde bestimmt und die Phagen zur Reamplifikation in *E. coli* verwendet.

Es wurden je 3 Selektionsrunden durchgeführt, in die jeweils unterschiedliche Mengen an scFv-Phagen eingesetzt wurden (Tab. 9).

Verwendete Antikörpergen-Bibliothek	Anzahl der Phagen eingesetzt in Runde 1 [cfu/Kavität]	Anzahl der Phagen eingesetzt in Runde 2 [cfu/Kavität]	Anzahl der Phagen eingesetzt in Runde 3 [cfu/Kavität]
HAL4	$1 \times 10^{11}$	$1 \times 10^{12}$	$1 \times 10^{12}$
HAL7	$1 \times 10^{11}$	$1 \times 10^{12}$	$1 \times 10^{12}$

Tab. 9: Für die Antikörperselektion verwendete Antikörpergen-Bibliotheken und Anzahl der in die jeweilige Selektionsrunde eingesetzten Phagen.

Der Titer der eluierten Phagen aus den drei Selektionsrunden stieg bei den aufgeführten Selektionen mit den beiden Antikörpergen-Bibliotheken von der ersten bis zur dritten Selektionsrunde sukzessiv an. In den Selektionsrunden 2 und 3 kam es zu einem erneuten Titeranstieg (Abb. 20).

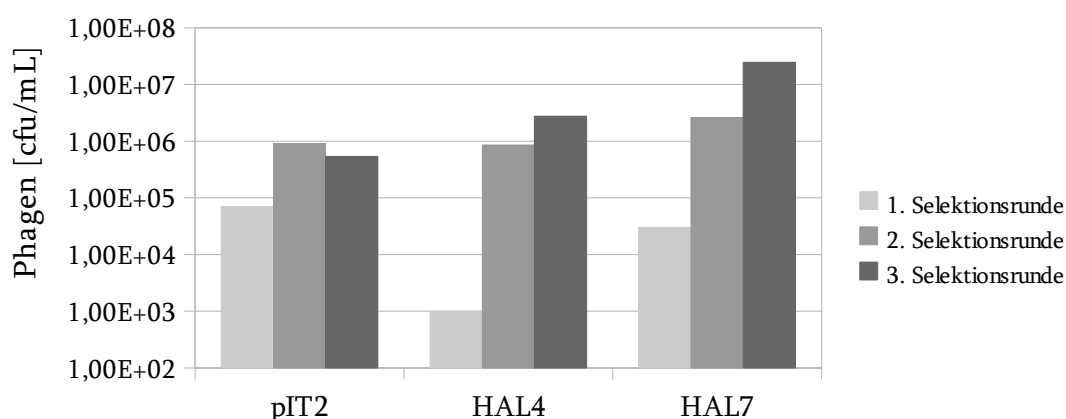


Abb. 20: Titer der eluierten Phagen aus den drei verwendeten Antikörpergen-Bibliotheken pIT2 Tomlinson I und J, HAL4 und HAL7 nach der Selektion auf CRP-Peptid-1.

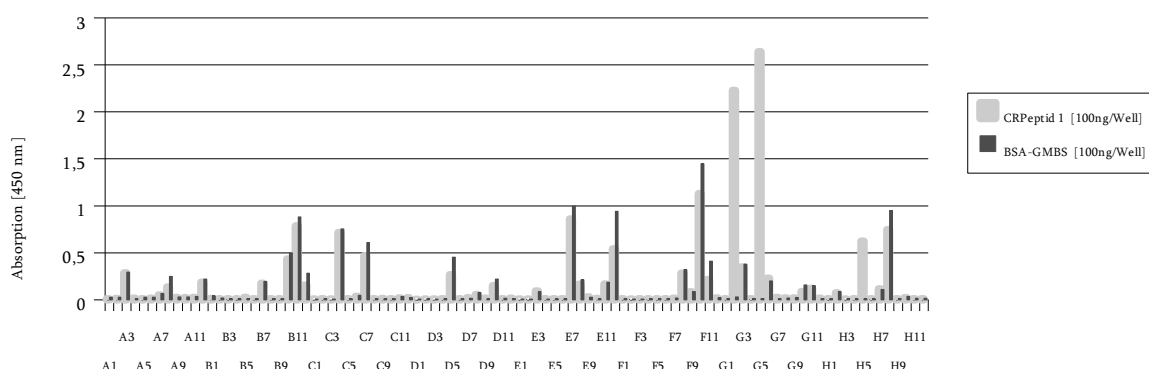
### 3.11 Analyse von Einzelklonen aus den Antikörper-Selektionen gegen CRP-Peptide im ELISA

#### 3.11.1 Produktion und proteinbiochemische Analyse

Einzelklone aus den vorangegangenen Selektionen gegen CRP-Peptid-1 wurden proteinbiochemisch untersucht.

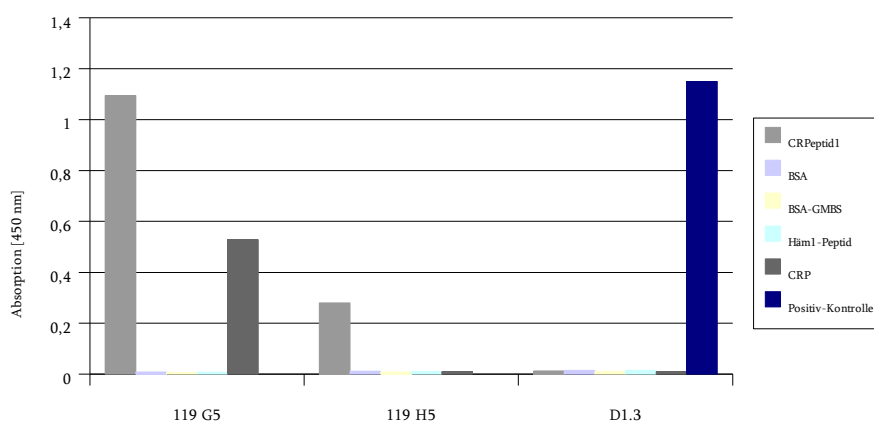
Aus den Selektionen gegen CRP-Peptid-1 wurden jeweils 92 Einzelklone, die aus den Selektionen mit der HAL4- und der HAL7-Bibliothek resultierten, in einer Mikrotiterplatte in 2 x TY-GA Medium über Nacht exprimiert. Die Expressionsüberstände wurden für einen indirekten Antigen-

ELISA auf CRP-Peptid-1 eingesetzt. 3 Klone (G2, G5 und H5) der 92 analysierten Einzelklone banden spezifisch an CRP-Peptid-1 (Abb. 21).



**Abb. 21: Indirekter Antigen-ELISA mit Expressionsüberständen von Einzelklonen der 2. und 3. Selektionsrunde aus der pHAL7-Antikörpergen-Bibliothek.** Auf der Abszisse sind die Positionen und späteren Bezeichnungen der Einzelklone angegeben. Der Nachweis der CRP-Peptid-1-spezifischen scFv (hellgrau) erfolgte mit myc-Tag-spezifischen murinen IgG und HRP-konjugierten Maus-spezifischen IgG, als Negativkontrolle wurde Sulfo-GMBS/BSA-Konjugat (dunkelgrau) verwendet.

Neben der Kontrolle der CRP-Peptid-1-spezifischen scFv-Klone auf CRP-Peptid-1 wurden die Klone LA119-G5 und LA119-H5 auf Bindung an vollständiges CRP-Protein im indirekten Antigen-ELISA getestet (Abb. 22). Als Negativkontrollen wurden BSA, BSA-GMBS-Konjugat und BSA-Häm1-Peptid verwendet. Der Lysozym-spezifische scFv D1.3 diente als Positiv-Kontrolle. Der Klon LA119-G5 erkannte sowohl CRP, als auch das von CRP abgeleitete Peptid CRP-Peptid-1. Im Gegensatz dazu erkannte der Klon LA119-H5 nur das CRP-Peptid-1, jedoch nicht vollständiges CRP Protein.



**Abb. 22: Indirekter Antigen-ELISA von CRP-Peptid-1-spezifischen scFv auf CRPeptid-1, vollständiges CRP-Protein und auf die Negativkontrollen BSA, BSA-GMBS-Linker-Konjugat und BSA-Häm1-Peptid-Konjugat.** Als Positivkontrolle diente der Lysozym-spezifische scFv D1.3. Der Nachweis erfolgte mit myc-Tag-spezifischen murinen IgG und HRP-konjugierten Maus-spezifischen IgG.

### 3.11.2 Sequenz-Analyse

Neben der ersten proteinbiochemischen Untersuchung der aus den Selektionen resultierenden scFv, wurden Klone mit einem ELISA-Signal, das zehnfach über dem Hintergrund lag, sequenziert.

Zuerst wurde das scFv-Gensegment über eine PCR mit den flankierenden Oligonukleotiden MHlacZ\_f und MHgIII\_r amplifiziert und über ein Agarosegel aufgetrennt. Die Amplifikate hatten eine Größe – abhängig von dem jeweiligen scFv – von 1000-1100 bp (Daten nicht gezeigt). Nach Aufreinigung dieser PCR-Amplifikate wurden die scFv-Gensegmente sequenziert, die Auswertung der Sequenzen hinsichtlich der Immunglobulinkeimbahnlinsen erfolgte mit der VBASE2 Datenbank (Retter *et al.*, 2005) (Tab. 10). Beide CRP-Peptid-1-spezifischen Klone besaßen leichte Ketten aus der Subfamilie LV1, jedoch schwere Ketten aus unterschiedlichen Subfamilien. Hier besaß LA119-G5 die schwere Kette aus der Subfamilie HV1, LA119-H5 aus der Subfamilie HV7. Die aus der Selektion gegen CRP-Peptid-1 hervorgegangenen Klone waren nicht identisch mit den Klonen LA13-IID4 oder LA13-IIC3, welche ebenfalls CRP-Peptid-1 erkannten.

Klon	Antikörpergen-Bibliothek	VH Gensegment (nach IMGT)	VL Gensegment (nach IMGT)
LA119-G5	HAL7	IGHV1-8*01	IGLV1-47*01
		IGHD2-21*01	IGLJ3*01 (same score:
		IGHJ4*02	IGLJ2*01)
LA119-H5	HAL7	IGHV7-4-1*02	IGLV1-40*01
		IGHD6-19*01/inv	IGLJ3*02
		IGHJ4*02	

**Tab. 10: Auflistung der aus den Selektionen resultierenden CRP-Peptid-1-spezifischen scFv LA119-G5 und LA119-H5.** Angegeben ist die verwendete Antikörpergen-Bibliothek, sowie die über die VBASE2-Immunglobulin-Keimbahnlinsen Datenbank ermittelten Keimbahnlinsen nach IMGT. In beiden Fällen besitzen die Klone Gensegmente der leichten Kette aus der Lambda-Subfamilie LV1, LA119-G5 besitzt die schwere Kette aus der Subfamilie HV1, LA119-H5 aus der Subfamilie HV7.

Die auf CRP-Peptid-1 selektierten Klone wurden nicht für Messungen auf dem Quarzresonator eingesetzt. Die Erkennung auf nativem CRP ist für diese Anwendung im Vergleich zu scFv, die auf CRP selektiert wurden, mangelhaft.

### 3.12 Kopplung unterschiedlicher Antikörperformate an Goldoberflächen

Für die CRP-Diagnostik mittels Quarzsensoren mussten Fängermoleküle an die Goldoberfläche des Quarzresonators immobilisiert werden. Die Anwendbarkeit unterschiedlicher Antikörperformate als Fängermoleküle, sowie diverse Kopplungsmethoden von diesen an eine Goldoberfläche wurden verglichen. Zu diesem Zweck wurden die im Rahmen dieser Arbeit generierten CRP-spezifischen Antikörper eingesetzt. Neben den herkömmlichen monovalenten scFv wurden modifizierte scFv mit einer endständigen Thiol-Gruppe, sowie bivalente scFv-Fc-Fusionsproteine generiert und für die weiteren Versuche eingesetzt.

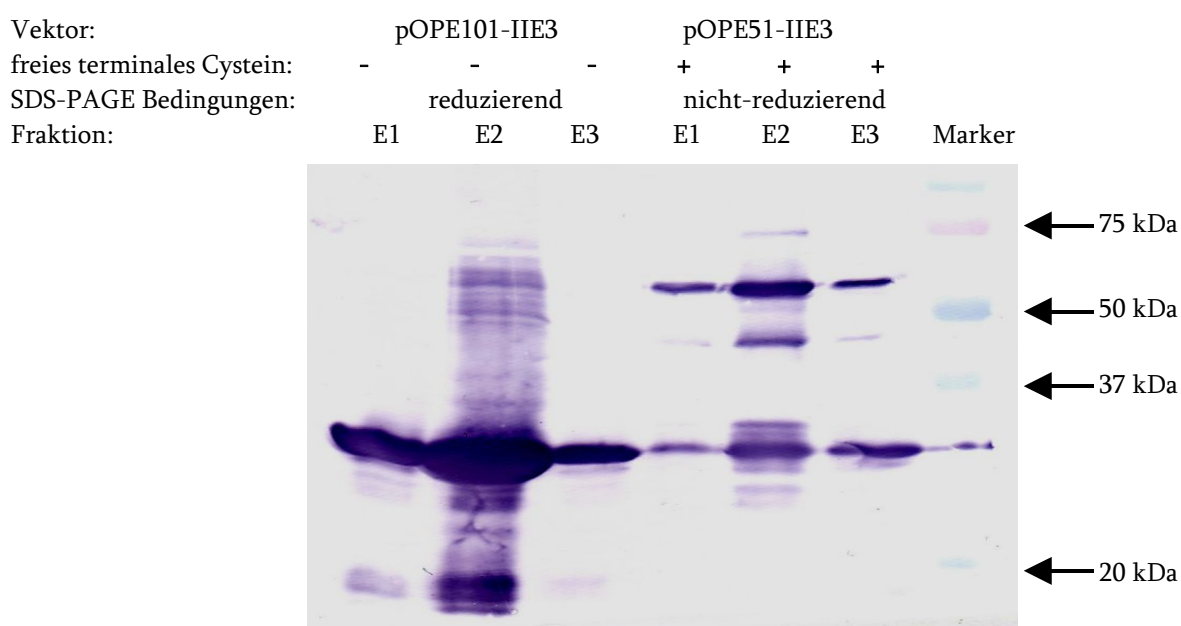
#### 3.12.1 Generierung CRP-spezifischer scFv mit einer C-terminalen Thiol-Gruppe

Zur Untersuchung der Kopplung CRP-spezifischer scFv an Goldoberflächen wurden CRP-spezifische scFv mit einem C-terminalen Cystein konstruiert. Das freie Cystein diente als freie Thiol-Gruppe.

Für die Klonierung der CRP-spezifischen scFv mit C-terminalen Cystein wurde das scFv-Gen in den Vektor pOPE51 kloniert. Dieser Vektor enthält die Sequenz für einen C-terminalen Penta-His-Tag direkt gefolgt von einem Cystein-Codon. Zwischen dem Schwefel-Atom des Cystein-Rests des scFv und einer Goldoberfläche kann eine kovalente Bindung ausgebildet werden (Shen *et al.*, 2005). Die scFv-Genfragmente wurden über die Restriktionsschnittstellen *Nco*I und *Not*I aus dem Phagemid-Vektor pIT2 in den Zielvektor LA79-pOPE51-XP subkloniert. Die Produktion der scFv erfolgte in *E. coli* XL-1 blue in 300 mL 2 x TY-Medium mit Glukose und Ampicillin im Schüttelkolben. Die durch ein Lac-Operon regulierte Expression der scFv wurde mit 50 µM IPTG induziert. Nach 20 Stunden Inkubation wurden die Zellen durch Zentrifugation sedimentiert, scFv aus dem Überstand und dem Periplasma wurden präpariert und über Nacht bei 4 °C unter Rühren gegen PBS dialysiert. Aufgereingt wurde über den His-Tag der scFv über eine Nickel-beladene *Chelating Sepharose*<sup>TM</sup> *Fast Flow Matrix* durch IMAC. Die Elution gebundener scFv-Fragmente erfolgte dreimal mit dem zweifachen Matrixvolumen PBS mit 0,1 M EDTA. Die Elutionsfraktionen wurden über Nacht bei 4 °C gegen PBS dialysiert und bei -20 °C ohne Schutzprotein gelagert. Die produzierten CRP-spezifischen scFv mit einer endständigen Thiol-Gruppe wurden in einem nicht-reduzierenden 12 %igen SDS-PAA-Gel gelelektrophoretisch aufgetrennt, als Vergleich wurden unmodifizierte CRP-spezifische scFv ohne endständige Thiol-



Gruppe unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert und mit Maus  $\alpha$ -myc-Tag IgG und AP-konjugierten Maus-spezifischen IgG nachgewiesen. Die theoretische molekulare Masse der produzierten scFv-Monomere auf der PVDF-Membran lag bei ca. 30 kDa. Gleichzeitig wurden jedoch über die Thiol-Gruppen Disulfidbrücken zwischen zwei thiol-modifizierten scFv ausgebildet, was zu Dimerisierungen der scFv führte, und somit einer weiteren Bande im Immunoblot bei ca. 60 kDa, führte (Abb. 23).



**Abb. 23: Immunoblots mit dem CRP-spezifischen scFv LA13-IIE3 mit und ohne freie Thiol-Gruppe.** Die CRP-spezifischen scFv pOPE101-LA13-IIE3 und pOPE51-LA13-IIE3 wurden in *E. coli* XL-1 Blue exprimiert, mittels IMAC über Nickel-NTA-Sepharose aufgereinigt und in einem 12 %igen SDS-PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die links dargestellten Elutionsfraktionen (E1-E3) von pOPE101-LA13-IIE3 wurden unter reduzierenden, die rechts dargestellten Elutionsfraktionen (E1-E3) von pOPE51-LA13-IIE3 unter nicht-reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Nach Transfer auf eine PVDF-Membran mittels Western-Blot wurde die Bindung der scFv mit dem Maus  $\alpha$ -myc-Tag IgG und AP-konjugierten Maus-spezifischen IgG detektiert.

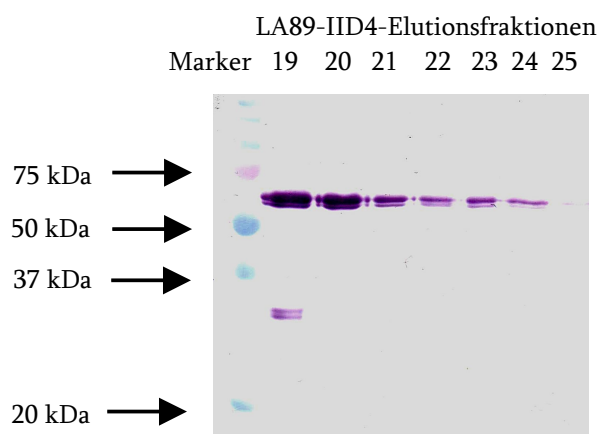
### 3.12.2 Generierung CRP-spezifischer scFv-Fc-Fusionsproteine und Produktion in HEK293T Zellen

Um monovalente und bivalente CRP-spezifische Antikörper und Antikörperfragmente zu vergleichen, wurde das CRP-spezifische scFv kodierende Genfragment in den Vektor pCMV-hIgG1-Fc-XP kloniert. Dieser Vektor trägt die Gensequenz für die *hinge*-Region, sowie CH2 und

CH3 von humanen IgG1 und ermöglicht die Expression von bivalenten scFv-Fc-Fusionsproteinen. Die in dem Vektor pIT2 vorliegenden scFv-Gene wurden über die Restriktionsschnittstellen *NcoI* und *NotI* in den Zielvektor pCMV-hIgG1-Fc-XP kloniert. Analog wurde mit der Negativkontrolle IIB6 (Mucin1-spezifisch) verfahren. Für die transiente Expression von scFv-Fc-Fusionsproteinen wurden die humanen embryonalen Nierenzellen HEK293T mit den präparierten Plasmiden pCMV-hIgG1-Fc-LA13-IIE3, -LA13-IID4 oder -LA13-IIC3 transfiziert.

ScFv-Fc-Fusionsproteine wurden über eine Protein A-Säule aufgereinigt. Anschließend erfolgte eine Konzentrationsbestimmung von scFv-Fc-Fusionsproteine mittels *Human-IgG-Capture-ELISA* und mittels Bradford-Test.

Die aus der Protein A-Aufreinigung resultierten Elutionsfraktionen wurden zur Kontrolle mittels SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen gelelektrophoretisch aufgetrennt, über einen Western-Blot auf PVDF-Membran transferiert und über eine Immunfärbung angefärbt (Abb. 24).



**Abb. 24: Immunoblot mit dem Protein A-aufgereinigten scFv-Fc-Fusionsproteins LA89-IID4.** Die Fraktionen 19-25 der Protein A-Aufreinigung von dem scFv-Fc-Fusionsprotein LA89-IID4 wurden in einem 10 %igen SDS-PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western-Blot Apparatur auf PVDF Membran transferiert. Der Nachweis erfolgte mit murinen anti-Mensch IgG und HRP-konjugierten anti-Maus-IgG. Die Proteinbestimmung der scFv-Fc-Fusionsproteine erfolgte über einen Bradford-Test, und ergab Konzentrationen von maximal 2,6 µg/mL für Elutionsfraktion 19.

Mittels Protein A-Affinitätschromatographie konnten CRP-spezifische scFv-Fc-Fusionsproteine aufgereinigt werden, die für die folgenden Analysen eingesetzt werden konnten.

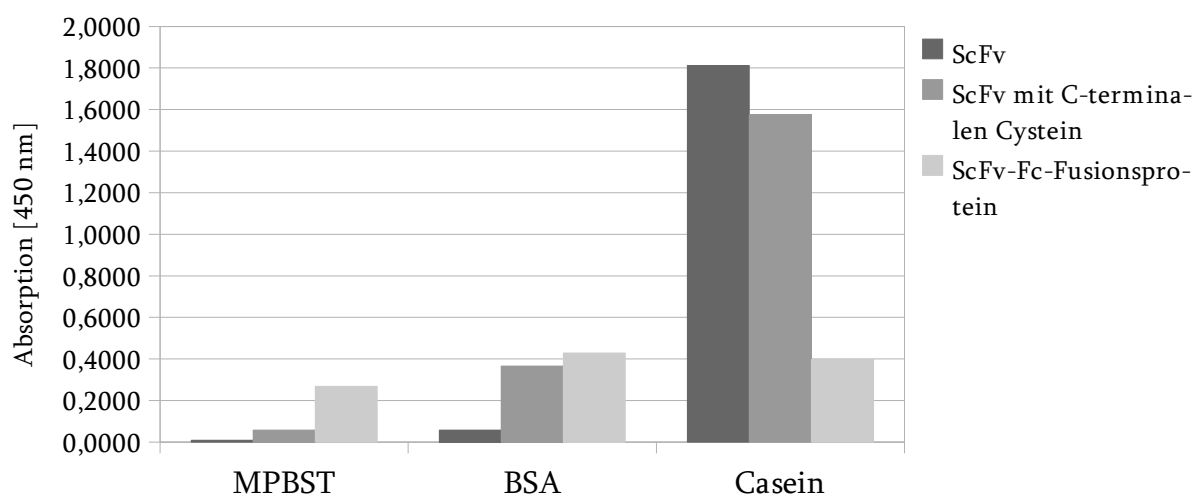
### 3.13 Untersuchung der Parameter für die Kopplung unterschiedlicher Antikörperformate an Gold

Um die Effizienz und Anwendbarkeit verschiedener Kopplungsmethoden, Antikörperformate und Absättigungsreagenzien für den Einsatz auf einem QCM miteinander zu vergleichen, sowie den Anteil funktioneller immobilisierter Antikörper zu bestimmen, wurde ein CRP-*Sandwich*-ELISA in einer Gold bedampften Polypropylen-Mikrotiterplatte durchgeführt. Dabei wurden verschiedene Kopplungsmethoden für die Immobilisierung von Antikörpern, unterschiedliche Antikörperformate und Absättigungsreagenzien miteinander kombiniert (Tab. 11):

Kopplungsmethoden	Antikörperformate	Absättigungsreagenzien
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 11-Mercaptoundecansäure</li> <li>• DSP</li> <li>• Glutaraldehyd-SAM (<i>self assembled monolayer</i>)</li> <li>• unbehandelte Goldoberfläche</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• scFv</li> <li>• scFv mit C-terminalem Cystein</li> <li>• scFv-Fc-Fusionsprotein</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Milchpulver</li> <li>• BSA</li> <li>• Casein</li> </ul>

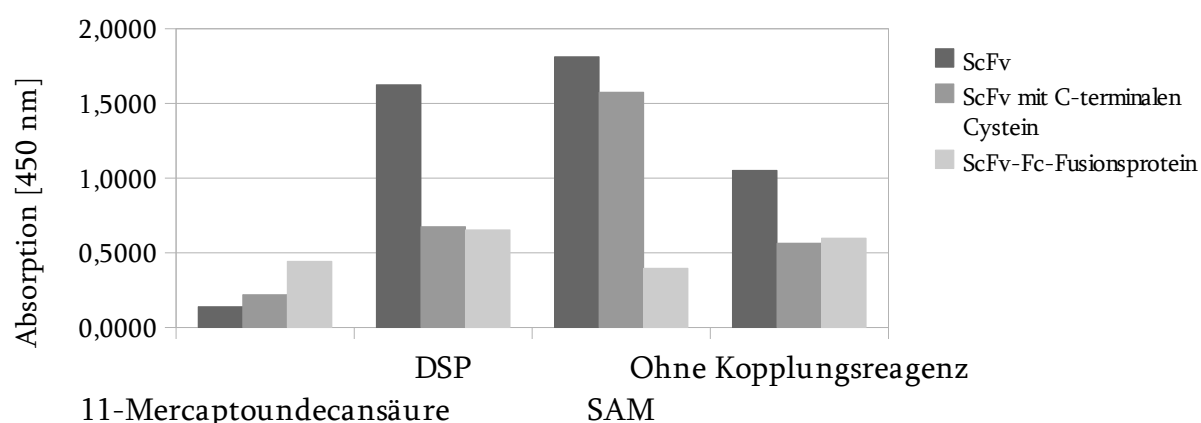
Tab. 11: Untersuchung verschiedener Parameter, wie Kopplungsmethode, Antikörperformat und Absättigungsreagenz für die Kopplung von Antikörpern an einer Goldoberfläche.

Nach den in Tab. 11 aufgeführten Kopplungsmethoden wurden unterschiedliche Antikörperformate an die Oberfläche von goldbedampften Mikrotiterplatten gekoppelt. Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen mit Milchpulver, BSA oder Casein abgesättigt. Im nächsten Schritt wurde CRP an die funktionellen immobilisierten Antikörper gebunden. Dann wurde mit murinen CRP-spezifischen IgG gebundenes CRP nachgewiesen. Zur Kontrolle unspezifisch bindender Antikörperformate oder Nachweisantikörper wurde der Inkubationsschritt mit CRP, bzw. CRP-spezifischer scFv, ausgelassen. Die Quantifizierung der Gesamtmenge an immobilisierten Antikörperfragmenten erfolgte mit einem myc-Tag-spezifischen murinen IgG (9E10) und HRP-konjugierten Maus-spezifischen IgG. Die beste spezifische Bindung von CRP wurde bei Verwendung von Casein als Absättigungsreagenz (Abb. 25) nachgewiesen, welches für die folgenden Untersuchungen verwendet wurde.



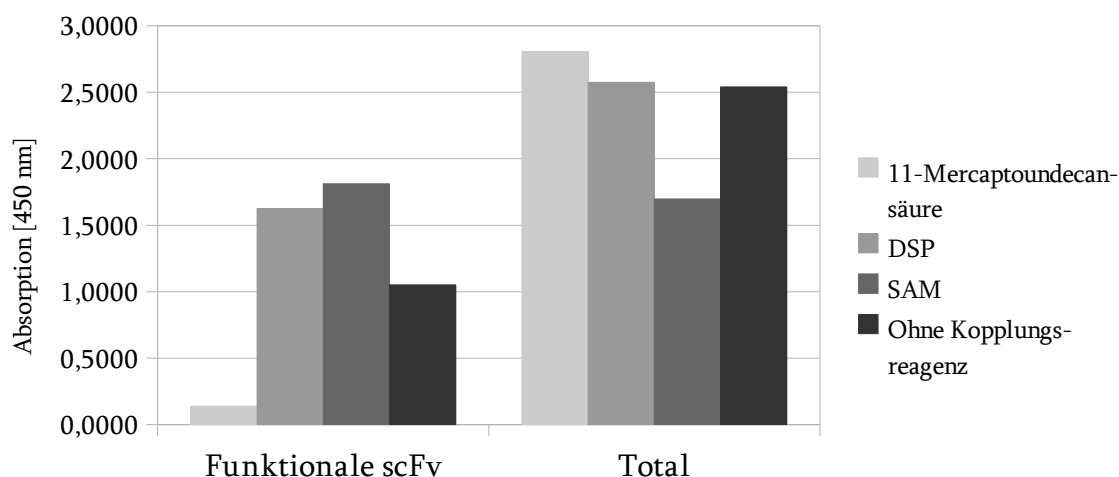
**Abb. 25: Vergleich der spezifischen Bindeaktivität verschiedener Antikörperformate nach Absättigung mit unterschiedlichen Blockierungsreagenzien.** ScFv, scFv-Fc-Fusionsproteine und modifizierte scFv wurden mittels Glutaraldehyd-SAM an die Goldoberfläche von Mikrotiterplatten gebracht, es wurde mit unterschiedlichen Blockierungsreagenzien abgesättigt, dann erfolgte der Nachweis über einen CRP-Sandwich-ELISA.

Bei dem Vergleich unterschiedlicher Kopplungsmethoden von Proteinen an Goldoberflächen, erwies sich die Immobilisierung über einen Glutaraldehyd-SAM als am Effektivsten. Hier wurden sowohl am meisten funktionale scFv-Fragmente, als auch funktionale scFv mit endständiger Thiol-Gruppe an die Goldoberfläche gekoppelt. Die Kopplung über 11-Mercaptoundecansäure war für alle Antikörperformate am wenigsten effektiv, auch im Vergleich zur unbehandelten Goldoberfläche (Abb. 26).



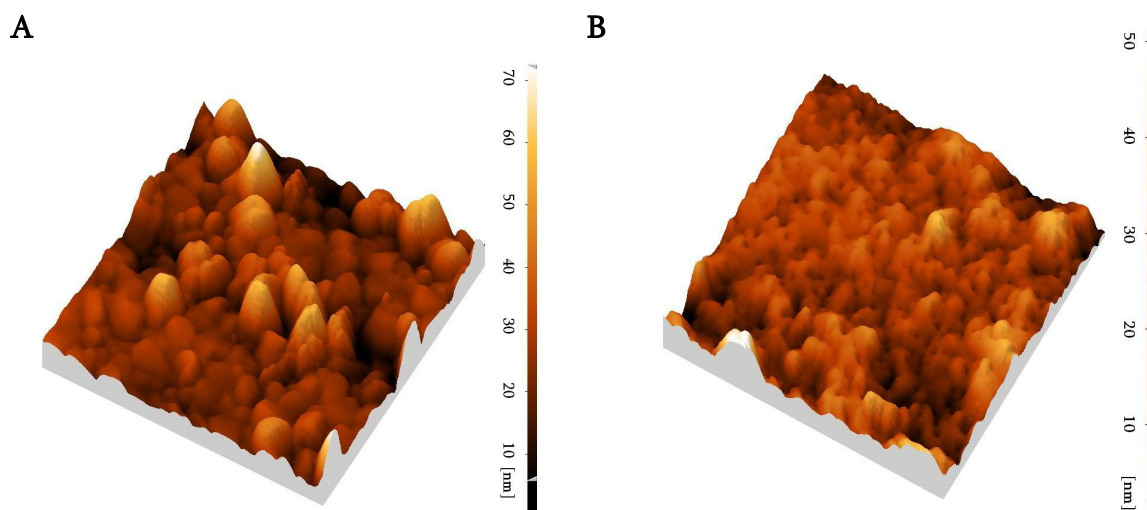
**Abb. 26: Kopplung unterschiedlicher Antikörperfragmente mit verschiedenen Kopplungsreagenzien.** Die Kopplung über einen Glutaraldehyd-SAM führte zu der höchsten Absorption, also zu der Immobilisation von der größten Menge funktionaler scFv. Als Absättigungsreagenz wurde jedesmal Casein verwendet. Der Nachweis erfolgte über ein CRP-Capturing, murinen CRP-spezifischen IgG und HRP-konjugierten Maus-spezifischen-IgG.

Um den Anteil funktionaler immobilisierter Antikörperfragmente mit der Menge an insgesamt gekoppelten Antikörperfragmenten zu vergleichen, wurden zwei verschiedene Nachweissysteme verwendet. Da ausschließlich CRP-spezifische Antikörperfragmente gekoppelt wurden, konnte die Funktionalität der immobilisierten Antikörper mittels CRP-Bindung definiert werden, indem CRP über einen Maus  $\alpha$ -CRP IgG nachgewiesen wurde. Die Gesamtmenge gekoppelter Antikörperfragmente wurde direkt über den myc-Tag-Nachweis bestimmt. Aufgrund der unterschiedlichen Nachweismethoden war jedoch kein direkter Vergleich zwischen gekoppelter Antikörper-Menge und deren Funktionalität möglich. Es konnte jedoch ermittelt werden, mit welcher Kopplungsmethode die höchste Menge an Antikörper-Fragment immobilisiert wird, mit welcher Kopplungsmethode die größte Menge Antikörper funktional bleibt, sowie welches Antikörperfragment die Kopplungsprozedur am besten übersteht. Die Menge an immobilisierten Antikörper-Fragment war bei der Kopplung mittels 11-Mercaptoundecansäure am größten (Abb. 27, rechte Datengruppe). Berücksichtigte man, dass bei der Generierung der beiden Datengruppen zwei unterschiedliche Nachweissysteme verwendet wurden, wurde dennoch der größte Anteil an gebundenen und funktionellen scFv mittels Glutaraldehyd-SAM immobilisiert (Abb. 27, linke Datengruppe).



**Abb. 27: Vergleich funktionaler scFv und Gesamtmenge gebundener scFv.** ScFv wurden mittels 11-Mercaptoundecansäure, DSP, Glutaraldehyd-SAM oder ohne Behandlung an die Goldoberfläche von Mikrotiterplatten gebracht. Unspezifische Bindungen wurden mit Casein abgeblockt. Dann erfolgte der Nachweis, entweder der Gesamtmenge über Maus  $\alpha$ -myc-Tag IgG (rechts), oder funktionaler scFv über die Bindung der scFv an CRP und anschließendem Nachweis über Maus  $\alpha$ -CRP IgG und HRP-konjugierte Maus-spezifische-IgG (links).

Die Oberfläche eines Quarzresonators nach Kopplung CRP-spezifischer scFv mittels Glutaraldehyd-SAM, Absättigung mit Casein und Inkubation mit CRP wurde im Vergleich zu der unbehandelten Goldoberfläche eines Quarzresonators über Rasterkraftmikroskopie visualisiert (Abb. 28).



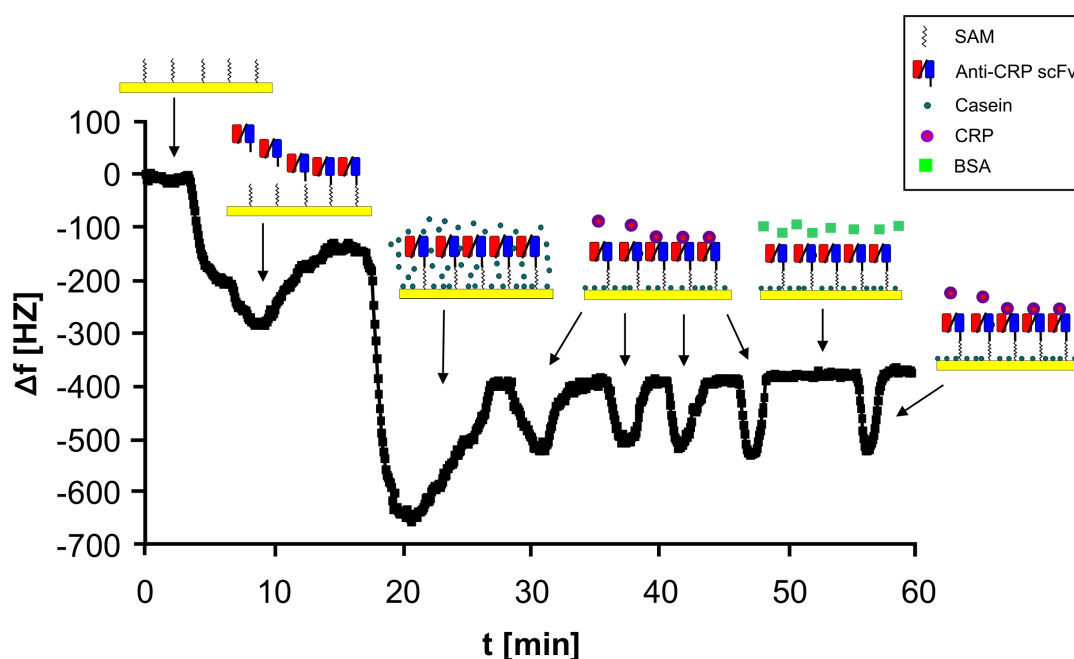
**Abb. 28: Rasterkraftmikroskopie-Darstellungen von unbehandelter und mit Protein beladener Quarzresonator-Goldoberfläche.** A: Die unbehandelte Goldoberfläche eines Quarzresonators besitzt herstellungsbedingt eine unebene Oberfläche mit Erhebungen bis zu 70 nm Höhe. B: Goldsensoroberfläche nach Kopplung CRP-spezifischer scFv über einen Glutaraldehyd-SAM, Absättigung der Oberfläche mit Casein, Inkubation mit CRP und Abwaschen von ungebundenem Material. Hier wurden weniger starke Erhebungen detektiert, jedoch eine höhere Anzahl an kleineren Strukturen.

### 3.14 Messung von CRP in einer Lösung in einem mikrofluidischen System

Nach dem Vergleich der Anwendbarkeit unterschiedlicher Kopplungsmethoden, Absättigungsreagenzien und Antikörperformate wurden Messungen mit einem CRP-spezifischen QCM Sensor am Institut für Mikrotechnik der Technischen Universität Braunschweig durchgeführt. Hierfür wurden CRP-spezifische scFv-Fragmente zur Bindung des CRPs an den Sensor und Casein als Absättigungsreagenz verwendet. Die Kopplung der Antikörperfragmente erfolgte mittels Glutaraldehyd-SAM.

Ein Quarzresonator wurde partiell auf die gewünschte Dicke geätzt, um bei einer Resonanzfrequenz  $f_0$  von etwa 20 MHz zu schwingen. Der Quarzresonator wurde anschließend in ein Fließsystem integriert, welches softlithographisch aus dem Elastomer PDMS hergestellt wurde. Massenzunahmen auf dem Quarzresonator sind stets als Abnahme der Eigenfrequenz des

Sensors sichtbar. Massenzunahmen in einem Frequenzdifferenzbereich von ca. 150 Hz wurden nach Kopplung der CRP-spezifischen scFv detektiert. Die Absättigung von freien Bindestellen auf der Quarz-Goldoberfläche durch Casein führte zu einer weiteren Frequenzabsenkung von ca. 250 Hz, sodass eine Differenz von ca. 400 Hz zwischen unbeladenem und mit CRP-spezifischen scFv beladenem Quarz vorlag. Der Fluß einer CRP-Lösung über den Quarz führte durch die Bindung an die immobilisierten scFv zu einer Massenerhöhung auf dem Quarz und somit einer Frequenzabnahme von ca. 120-150 Hz. Diese Messungen konnten mehrfach wiederholt werden (Abb. 29). Die Injektion einer BSA-Lösung über den Quarzmikrosensor führte zu keiner detektierbaren Frequenzänderung, und dementsprechend zu keiner Massenzunahme. Der Quarzresonator detektierte auch nach dem Test von BSA erneut eine spezifische Bindung von CRP. Die Ergebnisse zeigen, dass das mikrofluidische System in der Lage ist, in wiederholten Zyklen spezifisch CRP zu erkennen.



**Abb. 29: Spezifische Messung von CRP mittels QCM-Sensor.** Wiederholte Messungen der Bindung von CRP an einen QCM-Sensor, der mit dem CRP-spezifischen scFv LA13-IIC3 gekoppelt wurde (5 x CRP, 1 x Negativkontrolle, nacheinander in 6 Regenerationszyklen). Nach Massenzunahmen, bedingt durch Anlagerung des CRP-spezifischen scFv LA13-IIC3 (10 min), Casein-Absättigung (20 min) und CRP (31 min, 38 min, 42 min, 48 min und 57 min), kommt es zu keiner unspezifischen Wechselwirkung mit BSA (52 min).

#### 4. Diskussion

In der medizinischen Diagnostik besteht ein hoher Bedarf an *point of care*-Detektionsmethoden zur ambulanten Bestimmung von Entzündungen und bakteriellen Infektionskrankheiten. C-reaktives Protein (CRP) kann hier als universeller Parameter zum Nachweis entzündlicher Erkrankungen herangezogen werden. Bei einem gesunden Erwachsenen liegt die Konzentration von CRP im Blut bei etwa 10 µg/mL. Bei einer entzündlichen Reaktion kann die Konzentration um etwa den 1000fachen Wert ansteigen (Black *et al.*, 2004). Bisher erfolgt die Bestimmung von CRP durch die Untersuchung von Blutproben in nicht-kalibrierbaren Einzeltests, die in speziellen Laboratorien durchgeführt werden müssen. Eine zeitnahe Bestimmung vor Ort, z. B. direkt in der Arztpraxis durch ein kalibrierbares und wieder verwendbares Mikroanalysesystem ist deshalb von großem Interesse.

##### 4.1 Humane rekombinante Antikörper gegen CRP

Für die Entwicklung eines Mikrosensorsystems für die Blutserumdiagnostik von CRP wurden CRP-spezifische Antikörper isoliert. Die Antikörper-Generierung mittels Phagen Display bietet den Vorteil gegenüber der Hybridomatechnologie, dass humane rekombinante Antikörper gegen toxische oder humane Moleküle mittels eines *in vitro*-Selektionssystems isoliert werden können (Winter und Milstein, 1991). Weiterhin kann die Selektion unter stringenten und kontrollierbaren Bedingungen (Salz, pH, Detergenzien, Temperatur etc.) erfolgen. Das für die Selektion verwendete Antigen CRP muss nativ und möglichst rein sein, damit Antikörperfragmente isoliert werden, die CRP, wie es im Blutserum vorliegt, erkennen. Es sind neben der nativen weitere molekulare Konformationen von CRP (Neo-CRP) bekannt, welche Neoantigene präsentieren, d. h. Antigenstrukturen, die auf dem nativen Molekül nicht vorhanden sind und durch Behandlung mit Urea oder Harnsäure, Erhitzen oder Adsorption an Polystyrol entstehen können (Potempa *et al.*, 1987, Ying *et al.*, 1989). Weiterhin kann das CRP-Pentamer in seine Untereinheiten zerfallen, sodass bei der Antikörper-Selektion Strukturen des Proteins zugänglich wären, welche im nativen Protein durch die kovalente Verknüpfung mit den anderen Protomeren maskiert wären. Aus diesem Grund wurde das für die Phagen Display-Selektion eingesetzte Zielproteins CRP vorab untersucht. Die Größenausschlusschromatographie zeigte, dass das verwendete CRP als Pentamer mit einer molekularen Masse von 115 kDa vorlag. Da das



CRP jedoch für das Panning adsorptiv an Polystyrol-Oberflächen immobilisiert wurde, konnten neoantigene Strukturen nicht völlig ausgeschlossen werden. Im CRP-*Sandwich*-ELISA wurde CRP über die isolierten CRP-spezifische Antikörperfragmente, die als Fängemoleküle eingesetzt wurden, immobilisiert und über murine  $\alpha$ -CRP IgG nachgewiesen. Diese Analysen zeigten, dass die isolierten Antikörperfragmente sowohl natives CRP, als auch das an Polystyrol adsorptiv gebundene CRP erkennen (Ying *et al.*, 1989), und damit für einen diagnostischen Biosensor zur CRP-Bestimmung aus dem Blutserum eingesetzt werden können. Weitere Untersuchungen bezüglich der molekularen Konformation von CRP können in einem ELISA mit den isolierten scFv und Urea-modifiziertem Neo-CRP durchgeführt werden. Bisher wurden CRP-spezifische scFv nur aus Phagen-Display-Bibliotheken isoliert, die aus mit humanem CRP immunisierten Vögeln oder Schafen generiert wurden. Da CRP ein in der Evolution hoch konserviertes Protein ist, musste eine ausreichend weit entfernte phylogenetische Verwandtschaft zwischen dem zur Immunisierung verwendeten CRP und dem immunisierten Organismus vorliegen (Leonard *et al.*, 2007, McBride *et al.*, 2008). Dagegen konnten mittels der verwendeten Phagen-Display-Technologie humane Antikörper gegen CRP aus universellen naiven *single-pot* Antikörpergen-Bibliotheken isoliert werden.

Es wurden 4 verschiedene Antikörpergen-Bibliotheken eingesetzt, die naiven humanen Antikörpergen-Bibliotheken HAL4 und HAL7 und die semisynthetischen Antikörpergen-Bibliotheken Tomlinson I und J. Aus der Selektion mit der HAL7-Antikörpergen-Bibliothek wurden zwei CRP-spezifische Antikörper isoliert, keine Antikörper konnten aus der HAL4-Antikörpergen-Bibliothek isoliert werden und 3 sequenzverschiedene Antikörperfragmente wurden aus den Tomlinson I und J Antikörpergen-Bibliotheken isoliert. Der Titer der eluierten Phagen aus der Selektion mit der HAL4-Antikörpergen-Bibliothek stieg während der drei Runden nicht an, wohingegen der Titer der HAL7-Antikörpergen-Bibliothek von der ersten bis zur dritten Selektionsrunde um etwa den Faktor 10 anstieg. Dies könnte bereits ein Hinweis dafür sein, dass aus der HAL7-Antikörpergen-Bibliothek erfolgreich CRP-spezifische Antikörper angereichert werden konnten, aus der HAL4-Antikörpergen-Bibliothek dagegen nicht. Die Menge der eluierten Phagen nach den Selektionen mit den Tomlinson I und J Antikörpergen-Bibliotheken nahm von der ersten bis zur dritten Runde zu. Der Helferphagenwechsel nach der ersten Selektionsrunde hat Einfluss auf den Titer der eluierten Phagen während der Antikörperselektion.

Die Antikörper-Genbibliotheken wurden mit dem Helferphagen *Hyperphage* verpackt, der eine polyvalente Präsentation ermöglicht (Rondot *et al.*, 2001). Um keine Einflüsse durch Aviditätseffekte zu haben, wurden die scFv-Klone nach der ersten Selektionsrunde in dem Helferphagen M13K07 verpackt, um die scFv monovalent zu präsentieren, wodurch eine Verringerung der apparenten Affinität der Antikörper-Phagen resultiert und schwachbindende Antikörper-Phagen in der zweiten Selektionsrunde nicht mehr angereichert werden, was die geringeren Elutionstiter in der zweiten Runde erklärt (persönliche Mitteilung Prof. Dübel). Da in den drei Runden der Selektionen mit den HAL-Antikörpergen-Bibliotheken jeweils die gleiche Menge an Phagen eingesetzt worden war, kann ein Einfluss der Phagenmenge auf die Zahl der eluierten Phagen ausgeschlossen werden.

Die beiden naiven Antikörpergen-Bibliotheken HAL4 und HAL7 unterscheiden sich in den verwendeten Gensegmenten für die leichte Kette. Während die HAL7-Antikörpergen-Bibliothek leichte Ketten des Lambda-Typs besitzt, wurden für die Konstruktion der HAL4-Antikörpergen-Bibliothek Kappa-Gensegmente verwendet. Die CDRs der leichten Ketten des Typs Lambda enthalten durchschnittlich eine größere Zahl an Aminosäuren, zudem variiert die Kettenlänge innerhalb dieses Subtyps stärker. Dies könnte im Vergleich zu Antikörpern mit einer leichten Kette des Kappa-Typs zur Selektion von CRP-Bindern geführt haben. Beide Klone aus der HAL7-Antikörpergen-Bibliothek enthalten das VL Gensegment IGLJ3\*01, welches im menschlichen Körper am zweithäufigsten vorkommt (Abe *et al.*, 1994). Die V-, D- und J-Gensegmente der schweren Kette, sowie das V-Gensegment der leichten Kette variieren bei beiden Klonen.

Während die naiven humanen Antikörpergen-Bibliotheken HAL4/7 leichte Ketten des Lambda- (VL1-VL10) und des Kappa-Typs (VK1, VK3 und VK4) enthalten (Hust *et al.*, 2007), wurden für die Konstruktion der semisynthetischen Antikörpergen-Bibliotheken Tomlinson I und J ausschließlich leichte Ketten des Kappa-Typs verwendet. Desweiteren basieren die leichten und die schweren Ketten dieser Antikörpergen-Bibliotheken auf Gensegmenten je einen Typs (VH: V $\gamma$ -23/DP-47 und JH4b; VK: O12/O2/DPK9 und J $\kappa$ 1) (Goletz *et al.*, 2002). Aus den Selektionen mit den Tomlinson I und J Antikörpergen-Bibliotheken konnten drei CRP-spezifische Klone isoliert werden. Dies zeigt, dass aus dem humanen Repertoire der leichten Kette dieses Kappa-Typs Antikörper generiert werden können, die CRP binden können. Da die Tomlinson Antikörpergen-Bibliotheken I und J nicht auf einem natürlichen Repertoire basieren, lässt sich daraus kein

direkter Bezug zu der HAL4-Antikörpergen-Bibliothek, die ebenfalls ausschließlich leichte Ketten des Kappa-Typs enthält. Die Isolation geeigneter Antikörperklone scheint von der verwendeten Antikörpergen-Bibliothek abhängig zu sein.

Weitere Unterschiede zwischen den Antikörperklonen TOB4-B11 und TOB5-D4 der naiven HAL7-Antikörpergen-Bibliothek und LA13-IIE3, LA13-IIC3 und LA13-IID4 aus den semisynthetischen Tomlinson-Antikörpergen-Bibliotheken wurden mittels Immunoblot nachgewiesen, hierzu wurden scFv-Präparationen für ca. 1,5 Jahre bei -20 °C ohne Zusatz von Schutzprotein gelagert, dann gelelektrophoretisch aufgetrennt und immunologisch gefärbt. TOB4-B11 und TOB5-D4 besitzen durch Längenunterschiede der CDRs eine etwas höhere apparente molekulare Masse als LA13-IIE3, LA13-IIC3 und LA13-IID4. Degradationsbanden waren nachweisbar, die nur wenig kleiner als das unprozessierte Antikörperfragment waren, hier kann evtl. das PelB-Peptid abgespalten worden sein. Dahingegen waren bei den Antikörperklonen aus den Tomlinson I und J Antikörpergen-Bibliotheken mehrere Degradationsbanden im Bereich von 10-20 kDa vorhanden. Das Protein scheint hier vorwiegend am C-terminalen Ende bzw. in der Mitte der Polypeptidkette proteolytisch abgebaut zu werden, während die Klone TOB4-B11 und TOB5-D4 näher am N-terminalen Ende degradiert werden. Ursache dafür kann der verwendete Glycin-Serin-Peptidlinker der Tomlinson-Bibliotheken sein. Hier scheint Degradation eher begünstigt zu sein, als im Yol-Peptidlinker der HAL-Antikörpergen-Bibliothek. Nichtsdestotrotz zeigen die Klone LA13-IIE3, LA13-IIC3 und LA13-IID4 im Gegensatz zu den scFv D1.3 und IIB6 eine hohe Stabilität in Stabilitätsanalysen nach mehrtägiger Lagerung bei 37 °C oder mehrmaliger Denaturierung mit 3 M Guanidiniumhydrochlorid (Daten nicht gezeigt) und eignen sich damit für den Einsatz in ein mikrofluidisches Quarzsensosystem.

Die Lagerung der präparierten CRP-spezifischen scFv erfolgt ohne Zugabe von Schutzprotein, Proteaseinhibitoren oder anderen stabilisierenden Agenzien, da die Antikörperfragmente für Sensormessungen direkt an die Sensoroberfläche gekoppelt werden müssen und zusätzliche Proteine stören würden. Untersuchungen von isolierten CRP-spezifischen scFv im indirekten Antigen-ELISA nach mehrtägiger Inkubation bei 37 °C ohne Schutzprotein in PBS zeigten, dass die Lagerung dieses scFv bei 37 °C ohne Funktionsverlust für mindestens 15 Tage möglich ist, im Vergleich dazu verlor der Lysozym-spezifische scFv D1.3 87,5 % seiner Aktivität. Bis zum jetzigen Zeitpunkt sind keine Angaben über die Stabilität weiterer CRP-spezifischer scFv bekannt, jedoch

über weitere Lysozym-spezifische scFv. Die *framework*-Region des D1.3 scFv wurde bei Villani *et al.* (2008) gezielt mutagenisiert, um einen stabilitätsoptimierten und humanisierten Lysozym-spezifischen scFv(H5)H90Tyr zu generieren. ELISA-Untersuchungen mit dieser Mutante zeigten, dass nach 7-tägiger Inkubation bei 37 °C in PBS noch etwa 60 % der scFv funktional waren. Vermutlich lässt sich die Stabilität von LA13-IIIE3 durch gezielte (Steipe *et al.*, 1994; Ewert *et al.*, 2003) oder ungerichtete Mutationen und eine anschließende Selektion (Hoogenboom *et al.*, 1998; Wörn und Plückthun, 2001) weiter steigern. Eine weitere Möglichkeit zur Stabilitätsverbesserung wäre ein DNA *shuffling*, in dem die schwere Kette mit unterschiedlichen leichten Ketten neu kombiniert wird und aus den neu generierten Antikörperklonen nach stabileren Klonen (Marks *et al.*, 1992; Jung *et al.*, 1999; Wörn und Plückthun, 2001; Monsellier *et al.*, 2006) oder nach Klonen mit einer höheren Affinität zu dem entsprechenden Antigen (Komissarov *et al.*, 1997; Krykbaev *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2007) selektiert werden kann. Weitere Stabilisierung von Antikörpern wäre *in vitro* durch „Pegylierung“ (Kim *et al.*, 2007) oder Glykosylierung (Sinclair *et al.*, 2005) möglich.

Die weitere proteinbiochemische Analyse der isolierten CRP-spezifischen Klone umfasste Affinitätsbestimmungen mittels Oberflächenplasmonresonanz. Gerade für den Einsatz der scFv auf einem mikrofluidischen Quarzresonator zur Blutserumanalyse sind Einflüsse der Messung durch die Bindekinetik der Antikörperfragmente zu berücksichtigen. Die Flußgeschwindigkeit und -dauer für die spätere Messung im Mikroanalysesystem müssen gemäß der Dissoziationskonstanten der scFv angepasst werden. Die Affinitäten der isolierten Klone aus der HAL7-Antikörpergen-Bibliothek wurden nicht bestimmt, Affinitäten im Bereich von  $1,1\text{--}2,6 \times 10^{-8}$  M wurden für aus den Tomlinson-Antikörpergen-Bibliotheken isolierte CRP-spezifische scFv gemessen. Mit Diversitäten von  $1,47 \times 10^8$  und  $1,37 \times 10^8$  unterschiedlichen Antikörperklonen für die Tomlinson-Antikörpergen-Bibliotheken I und J (Goletz *et al.*, 2002) sind Affinitäten ( $K_D$ ) im Bereich von  $1,1 \times 10^{-8}$  –  $2,6 \times 10^{-8}$  M für hieraus isolierte scFv ungewöhnlich hoch und werden eher für Bibliotheken mit höherer Diversität (ab  $10^9$  unterschiedliche Klone) erwartet (Hoogenboom, 1997). Die  $K_D$ -Werte aus den kinetischen Analysen wurden mit dem Bindemodell 1:1-Langmuir berechnet. Nicht berücksichtigt wurden *bulk*-Effekte, die durch Aggregate oder Verunreinigungen in der Probe verursacht werden können, wenn nach Laufpufferfluss der Probenfluss erfolgte, der eine andere Refraktivität aufwies (Kyo *et al.*, 2005). Diese Effekte werden

während der Messung durch eine anfänglich hohe Dissoziationsgeschwindigkeit sichtbar. Der Vorteil der hier durchgeführten kinetischen Analysen mit SPR basierten Biosensoren gegenüber *steady-state*-Analysen im ELISA ist die separate Bestimmung von Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten (Jason-Moller *et al.*, 2006). So sind detaillierte Analysen von beispielsweise Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen möglich, und gerade für den Einsatz auf Biosensoren sind Aussagen zu Komplexbildung und Komplexzerfall von großem Interesse (Hahnefeld *et al.*, 2004; Moll *et al.*, 2006). Affinitäten ( $K_D$ ) von  $2,54 \times 10^{-8}$  bis  $3,53 \times 10^{-10}$  M für weitere CRP-spezifische scFv wurden publiziert. Diese wurden aus einer Immun-Bibliothek aus Hühnern isoliert (Leonard *et al.*, 2007), Affinitäts-Angaben zu CRP-spezifischen scFv aus naiven humanen Phagen-Display Antikörpergen-Bibliotheken sind bisher nicht bekannt.

Für die Anwendung in ein Mikroanalysesystem, welches zusätzlich zu der Sensoreinheit, eine Anreicherungseinheit enthält, ist es von Interesse, verschiedene Antikörper einzusetzen, welche unterschiedliche Epitope auf dem Analyten erkennen. Dazu wurden die Epitope der isolierten CRP-spezifischen scFv auf dem Antigen CRP näher untersucht. Klassischerweise wird die Bestimmung der Epitope von mehreren Antikörpern mit einem ELISA durchgeführt. Hierbei ist ein Antikörper am Antigen gebunden und die Bindung eines zweiten Antikörpers auf dem selben Antigen wird detektiert. Die gleichzeitige Bindung beider Antikörper kann einfach detektiert werden, jedoch ergeben sich Schwierigkeiten bei der Interpretation bei fehlender Bindung des zweiten Antikörpers (Goding, 1983). Bei der Epitop-Bestimmung mittels Oberflächenplasmonresonanz erfolgt der Nachweis über Detektion von Massenzunahme. In dieser Arbeit wurde hierfür das Antigen auf dem Chip immobilisiert und ein Fluß von zwei Antikörpern nacheinander durchgeführt. Der erste Antikörper bindet und eine Massenzunahme wird über den Sensor detektiert. Dabei muss er bis zur Sättigung über den Sensor geleitet werden. Bei Erkennung eines zweiten anderen Epitops des zweiten Antikörpers auf dem Antigen kommt es zu einer weiteren Massenzunahme, die über den Sensor detektiert wird. Erkennt der zweite Antikörper dasselbe Epitop wie der erste, erfolgt keine weitere Massenzunahme auf dem Chip, da das erste Epitop bereits durch den ersten Antikörper gebunden ist. Eine Markierung der Antikörper ist nicht nötig, die Messungen können in Echtzeit aufgenommen und analysiert werden (Fägerstam *et al.*, 1990; Malmborg und Borrebaeck, 1995). Die Untersuchung, ob die drei CRP-spezifischen scFv aus den Tomlinson I und J Antikörpergen-Bibliotheken unterschiedliche Epitope erkennen

bzw. sich bei der CRP-Bindung nicht in ihrer Bindung beeinflussen, wurde zuerst über Oberflächenplasmonresonanz durchgeführt. Diese Methode ermöglicht die Bestimmung von sowohl konformationellen Epitopen, also Antigenbindestellen, die eine Sekundär- oder Tertiärstruktur ausbilden, als auch linearen Epitopen, solange diese auf dem gekoppelten Antigen vorhanden sind. Zwei dieser Antikörperfragmente erkennen dasselbe Epitop auf CRP bzw. Epitope, die sehr nahe beieinander liegen. LA13-IIE3 erkennt ein anderes Epitop als LA13-IIC3 und LA13-IID4. Bei Injektion von LA13-IIE3 über den Sensor und anschließender Injektion von LA13-IIC3 oder LA13-IID4 kam es zu einem erneuten Massenanstieg auf dem Sensor. Wurden jedoch zuerst LA13-IIC3 oder LA13-IID4 über den Sensor geleitet und danach als zweiter Antikörper LA13-IIE3, kam es zu keinem weiteren Masseanstieg, was für eine Erkennung der drei Antikörper desselben Epitopes spricht. Möglicherweise könnte bei Bindung von LA13-IIC3 oder LA13-IID4 an das entsprechende Epitop, die Zugänglichkeit des Epitopes von LA13-IIE3 behindert sein, was bei der Injektion der Antikörper in umgekehrter Reihenfolge nicht auftreten würde. Die drei CRP-spezifischen Antikörper, die aus den Tomlinson I und J Antikörpergen-Bibliotheken isoliert wurden, banden lineares CRP im Western Blot. Daher konnte eine genauere Bestimmung der linearen Epitope der Antikörperfragmente erfolgen. Bei dieser Methode werden CRP-spezifische Antikörperfragmente auf sequentiellen linearen CRP-Peptiden, welche auf modifizierten Filterpapier synthetisiert wurden, inkubiert. Durch Immunfärbung der gebundenen Antikörper können die Peptidsequenzen bestimmt werden, an welche die Antikörper gebunden haben (Frank und Dübel, 2005). LA13-IIC3 und LA13-IID4 erkennen ein anderes Epitop als LA13-IIE3. Das Epitop von LA13-IIE3 ist nahe der inneren Pore des CRP-Moleküls lokalisiert, während LA13-IIC3 und LA13-IID4 ein Epitop an der Molekül-Peripherie erkennen. Eine Hinderung der Zugänglichkeit des Epitopes für LA13-IIE3 wäre durch Bindung von LA13-IIC3 oder LA13-IID4 an ihr Epitop wahrscheinlich denkbar. Beide Epitope bilden auf dem nativen CRP Sekundärstrukturen aus. Das Epitop von LA13-IIE3 bildet eine  $\alpha$ -Helix aus, während das Epitop von LA13-IIC3 und LA13-IID4 eine  $\beta$ -Faltblattstruktur ausbildet. LA13-IIE3, LA13-IIC3 und LA13-IID4 erkennen sowohl natives, als auch denaturiertes CRP, d. h. diese Untersuchungen lassen die Vermutung zu, dass die isolierten Antikörper sowohl natives CRP als auch Neo-CRP binden.

#### 4.2 Selektion von humanen rekombinanten Antikörperfragmenten gegen CRP-Peptide

Nach der Entschlüsselung des humanen Genoms (Venter *et al.*, 2001; Lander *et al.*, 2001) besteht die nächste Aufgabe in der Analyse des humanen Proteoms. Realisiert werden können diese Analysen mithilfe von 2D-PAGE und anschließendem Immunoblot, Fluoreszenz-Mikroskopie, Affinitätschromatographie oder Protein-Microarrays – sofern die erforderlichen Anzahl an Antikörpern als proteinbindende Moleküle zur Verfügung steht (Uhlen *et al.*, 2005). Die Generierung dieser Vielzahl von Antikörpern ist stark auf das Vorhandensein geeigneter Antigene restringiert. Eine Möglichkeit, diese Barriere jedoch zu überwinden, ist die Verwendung von Peptiden als Antigene (Hust und Dübel, 2004). Mit der Selektion von scFv aus Antikörper-Genbibliotheken gegen CRP und der anschließenden Epitop-Bestimmung der isolierten scFv konnte die Immunogenität und Zugänglichkeit einzelner CRP-Peptidsequenzen empirisch ermittelt werden. In einer anschließenden Selektion von scFv aus einer Antikörper-Genbibliothek gegen synthetisch hergestellte Peptide, die die zuvor bestimmten Epitope umfassten, wurde analysiert, ob Antikörper gegen diese Epitope isoliert werden können. Die Epitopsequenzen wurden in Form von 18mer-Peptiden mit einem zusätzlichen Cystein am N-Terminus der Polypeptidkette synthetisiert. Das C-Terminale Cystein dieser Peptide wurde für den Einsatz in Antikörperselektionen an *Carrier*-Proteine gekoppelt, in diesem Fall an BSA, um immobilisiert werden zu können (Oshima und Atassi, 1989; Chames *et al.*, 2001). Im SDS-Gel wurde das Peptid/BSA-Konjugat als Schmier sichtbar, da pro Molekül BSA unterschiedliche Mengen Peptid gekoppelt sind (mündliche Mitteilung: L. Toleikis, Merck Co. KG, Darmstadt). Die isolierten scFv aus den Selektionen gegen CRP-Peptide waren interessanterweise nicht identisch mit denen aus den Selektionen gegen CRP-Protein, obwohl für die Selektion dieselbe Antikörper-Genbibliothek verwendet wurde und die eingesetzten Peptide den Epitopen der scFv, die aus den Selektionen mit nativem CRP-Protein isoliert wurden, entsprachen. Der scFv LA119-G5 band sowohl spezifisch CRP-Peptid, als auch das native CRP-Protein, letzteres jedoch weniger stark als das Peptid. Der scFv LA119-H5 band dagegen nur das Peptid und nicht das native CRP-Protein. Die CRP-Peptid-spezifischen scFv enthalten ebenso wie die CRP-Protein-spezifischen scFv das VL Gensegment IGLJ3\*01, sowie ein Gensegment des Subtyps LV1, wie es auch bei dem Klon TOB4-B11 vorkommt. Die Gensegmente der schweren Ketten variieren sowohl bei den CRP-Peptid-spezifischen, als auch bei den CRP-Protein-spezifischen Klonen. Derartige Eigenschaften von

scFv, die gegen Peptide selektiert wurden, zeigte sich auch bei scFv aus weiteren Selektionen gegen Peptide, welche sich von der Sequenz des Influenza Virus-Hüllproteins ableiteten (Daten nicht gezeigt). Dabei wurden scFv isoliert, welche das native Protein ebenfalls nicht binden. Untersuchungen und praktische Evaluation von Peptiden, die exponiert vorliegen (z.B. mit der Software ASS 1.0 (*accessible surface scans*) rechnerisch ermittelt), führten zu keiner Isolation CRP-spezifischer scFv (Daten nicht gezeigt). Für die Selektion von Antikörpern gegen determinierte Epitope eines Proteins ist eine Selektion gegen dessen Peptide also nur bedingt geeignet. Die Antikörper-Selektion mittels Phagen-Display ist extrem abhängig vom eingesetzten Antigen und Peptide repräsentieren nur bedingt ein Protein.

#### 4.3 Kopplung von scFv an Goldoberflächen

Quarzmikrowaagen (QCM) finden häufig Einsatz als chemische Sensoren oder Immunosensoren (Ward *et al.*, 1990; Kurosawa *et al.*, 2003), und wurden hier für die Sensoreinheit des CRP-Mikroanalysesystems verwendet. Das QCM-Mikrosensorsystem basiert auf einem goldbeschichteten Quarzresonator, an den der Nachweisantikörper als Fängermolekül gekoppelt wird. Deshalb ist eine optimierte Kopplung des Antikörpers, in dieser Arbeit des CRP-spezifischen scFv, von entscheidender Bedeutung für die Qualität des Mikrosensorsystems. Nach der Charakterisierung und Analyse der isolierten CRP-spezifischen Antikörperfragmente, wurden diese in das Quarzmikrowaagen-Massendetektorsystem als spezifische Fängermoleküle integriert. Dazu wurden sie zuerst auf der Goldoberfläche der Quarzmikrowaage immobilisiert. Die Antikörperfragmente wurden entweder direkt chemisorptiv auf der Goldelektrode des Sensors immobilisiert oder kovalent unter Verwendung unterschiedlicher selbstorganisierender Monolayer (SAM). Bei der ersten Variante wurden modifizierte Antikörperfragmente, die ein C-terminales Cystein und somit eine freie gut zugängliche Thiolgruppe besaßen, genutzt und chemisorptiv direkt an die Sensoroberfläche gebunden (Vikholm-Lundin und Albers, 2005). Eine andere Variante basiert auf der Verwendung eines SAM (Aizawa *et al.*, 2006). Es handelt sich dabei um langkettige funktionalisierte Alkanthiole, die ebenfalls mittels Chemisorption an die Goldoberfläche gebunden werden. Die Kopplung der Antikörperfragmente erfolgte anschließend durch kovalente Bindung an diese Alkanthiole. Für diese Kopplungsvariante kann ein SAM bestehend aus den Komponenten Cystamin und Glutardialdehyd genutzt werden (Michalzik *et al.*,



2005a). Die Untersuchungen zur Bindung von Antikörpern an eine Goldoberfläche wurden an den goldbeschichteten Kavitäten einer Mikrotiterplatte durchgeführt. Der gebundene Antikörper wurde mittels ELISA nachgewiesen. Bei der Kopplung von unmodifizierten scFv über Cystamin und Glutaraldehyd an die Sensoroberfläche verblieb der höchste Anteil der Antikörper funktional im Vergleich zu den anderen getesteten Kopplungsprotokollen, wie z.B. die Kopplung über 11-Mercaptoundecansäure (Winter, 2000; Jiang *et al.*, 2005; Love *et al.*, 2005; Aizawa *et al.*, 2006; Shen *et al.*, 2008) oder über Dithiobis-(succinimidylpropionat) (DSP) (Storri *et al.*, 1998; Hengerer *et al.*, 1999). Bei der Kopplung der Antikörper mittels 11-Mercaptoundecansäure löste sich zum Teil die auf die Polypropylenplatten aufgedampfte Goldschicht. Um den Anteil gebundener funktionaler Antikörper zu bestimmen, mussten deshalb Versuche mit verschiedenen Kopplungsmethoden auf sich weniger leicht ablösenden Goldoberflächen durchgeführt werden.

Weiterhin wurden verschiedene Antikörperformate für die Kopplung an Goldoberflächen getestet. Ein Antikörperformat, welches auf der Goldoberfläche der Quarzmikrowaage getestet wurde, war das scFv-Fc-Format. Verglichen mit scFv-Fc-Fusionsproteinen ließen sich mehr funktionale scFv über DSP und Glutaraldehyd-SAM an Goldoberflächen koppeln. Je dichter und einheitlicher eine Goldoberfläche mit Antikörpern bedeckt ist, desto sensitiver und spezifischer lassen sich die entsprechenden Analyten aus einer Lösung detektieren (Shen *et al.*, 2005). Vermutlich lassen sich die kleineren scFv-Moleküle in einer höheren Dichte an eine Oberfläche koppeln als die scFv-Fc-Moleküle mit ihrer dreimal größeren molekularen Masse. Die Verwendung von scFv mit zusätzlicher Thiol-Gruppe wurde für eine Optimierung der Oberflächenbedeckung und eine gerichtete Orientierung der Antikörper durchgeführt (Liu *et al.*, 2001; Shen *et al.*, 2005). Da zum Teil die Cystein-scFv intermolekulare Disulfidbrücken ausbilden und dimerisiert vorliegen und nur ein Teil der Cystein-scFv ungepaart vorliegen, kann die Kopplungseffizienz dieses Formats durch eine gezielte Reduktion der Disulfidbrücken mittels Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin (TCEP) noch erhöht werden (Gray, 1993). Die Quarzsensorgoldoberfläche wurde mittels Rasterkraftmikroskopie (RKM) (Hayden *et al.*, 2003) visualisiert. In dieser Arbeit erfolgte nach Kopplung CRP-spezifischer scFv, Absättigung freier Bindestellen mit Casein und Bindung von CRP die Rasterkraftmikroskop-Untersuchungen. Da jedoch schon der unbeladene Quarz eine unebene Oberfläche mit Erhebungen von bis 70 nm Höhe aufwies, konnten trotz vieler kleinerer „doughnutförmiger“ Strukturen in der Größe weniger Nanometer,

was in etwa der Größe eines CRP-Pentamers entspricht (Volanakis, 2001), auf der Oberflächenstruktur des beladenen Quarzresonators keine eindeutigen Aussagen mittels RKM-Analyse über die Verteilung von funktionellen scFv-Molekülen auf der Goldoberfläche getroffen werden. Lin *et al.* (2006) detektierten ähnliche Strukturen im gleichen Größenbereich über Rasterkraftmikroskopie und identifizierten diese als CRP-Moleküle.

#### 4.4 „Lab-on-chip“-Systeme für die Serumdiagnostik von CRP

C-reaktives Protein ist ein Akute-Phase-Protein, welches sehr kurze Zeit nach einem inflammatorischen Stimulus im Blut bis auf den Faktor 1000 der Normalkonzentration ansteigt. Es spielt eine wichtige Rolle in der unspezifischen Immunabwehr und gilt als wichtiger akuter Entzündungsmarker in der klinischen Diagnostik (Ablij *et al.*, 2002). Quarzbasierte Mikrosensorsysteme ermöglichen eine zeit- und somit kostengünstige Diagnose von CRP, die direkt am Patienten durchgeführt werden kann. Dafür wurde die Quarzresonator-Sensoreinheit so konstruiert, dass eine spätere Integration von Fließkanälen und Ventilen möglich ist. Polydimethylsiloxan (PDMS) eignet sich als Ausgangsmaterial durch seine Biokompatibilität, Handhabbarkeit und geringen Kosten. Es ist transparent für Wellenlängen im sichtbaren Bereich und dauerhaft mechanisch stabil (Nguyen *et al.*, 2004). Mittels Sauerstoffplasma lassen sich Quarz- und PDMS-Strukturen kovalent verbinden (Michalzik *et al.*, 2005b). Für eine automatisierte *point-of-care*-Messung im Durchfluss wurde eine Fließzelle mit einem Volumen von 9  $\mu\text{L}$  aus PDMS entwickelt, bei der der Quarzresonator vollständig in die Fließzelle integriert worden war (Michalzik *et al.*, 2004; Michalzik *et al.*, 2005a; Michalzik *et al.*, 2007). Messungen mit CRP wurden auf dem Quarzresonator im Fließsystem erfolgreich durchgeführt. Dabei gelang unter Verwendung eines einzigen Sensors die mehrfache Detektion von CRP in einer Lösung, wobei die Regeneration durch Pufferfluß erfolgte. Injektionen von BSA als Kontrollprotein belegten die Spezifität des Immunosensors, hier kam es zu keiner Frequenzabnahme des Sensors. CRP in einer 1 mg/mL Lösung führt zu einer Frequenzabnahme von ca. 120–150 Hz, also einer deutlich messbaren Massenzunahme. Derartig hohe CRP-Konzentration können physiologisch nach einem akuten inflammatorischen Stimulus im Blutserum auftreten, während die normale CRP-Konzentration bei gesunden Menschen in einem tausendfach geringeren Bereich liegt (Black *et al.*, 2004). Eine Optimierung der Kopplung der CRP-spezifischen scFv an die Sensoroberfläche

könnte die Sensitivität noch weiter steigern (Shen *et al.*, 2005). Weiterhin könnten Frequenzschwankungen über Abdichtung und Immobilisierung des Quarzresonators in einer flüssigkeitsgefüllten Kammer vermindert werden (Sota *et al.*, 2002), was ebenfalls die Sensitivität des Sensors erhöhen sollte. Rasterkraftelektronenmikroskopische Messungen zeigten, dass die Sensoroberfläche des eingesetzten Chips sehr rauh war. Eine Ebnung der Oberfläche könnte ebenfalls zur Abnahme von Frequenzschwankungen und hohen Hintergrundsignalen führen. Alternativ könnte ein Rechenmodell, welches die Rauheit der Sensoroberfläche bei der Frequenzauswertung miteinbezieht, eingesetzt werden. Hier wäre jedoch erforderlich, diese Schwankungen durch eine Kalibrierungsmessung zu normalisieren (Theisen *et al.*, 2004). Die Regeneration des Sensors erfolgte in der vorliegenden Arbeit über die Dissoziation des Analyten durch Laufpufferfluss. Bei Verwendung CRP-spezifischer Antikörper mit einer höheren Affinität wäre diese Form der Regeneration zeitaufwändiger oder unter Umständen nicht möglich. Hier könnte der Sensor über Guanidiniumhydrochlorid oder andere hochmolare Salzpuffer regeneriert werden. Es konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die isolierten scFv aus den Antikörpergen-Bibliotheken Tomlinson I und J hochstabil sind und selbst nach mehrfacher Regeneration weiterhin funktional bleiben. Eine Affinitätsreifung kann ausgehend von bereits konstruierten Mutations-Bibliothek erfolgen, dabei könnte gleichzeitig auf noch höhere Stabilität selektiert werden.

Quarzmikrowaagen werden im Bereich der Biosensoren in einer großen Bandbreite verwendet und erfuhren im Laufe der letzten 5-10 Jahre aufgrund ihrer Vielseitigkeit und breiten Anwendbarkeit (Cooper *et al.*, 2007) größeres Interesse. Zahlreiche QCM-basierte CRP-Assays wurden in den letzten Jahren entwickelt (Kurosawa *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2004), in denen unter anderem eine Signalamplifikation durch die Kopplung des Analyten CRP an *Latexbeads* (*latex piezoelectric immunoassay*, LPIA) erzielt wurde (Kurosawa *et al.*, 2000; Aizawa *et al.*, 2001; Kurosawa *et al.*, 2003). Hierbei werden mit CRP-Antikörpern beschichtete Latexbeads verwendet, welche bei Kontakt mit dem nachzuweisenden Stoff agglomerieren, eine Quarzmikrowaage dient dabei zur Detektion. Von monoklonalen Antikörpern abgeleitete scFv wurden bereits 2004 in QCMs eingesetzt (Kurosawa *et al.*, 2004). 2005 wurden erstmalig rekombinante scFv-Antikörper, die aus einer Phagen Display-Bibliothek isoliert wurden, für einen QCM-basierten Mikrosensor eingesetzt (Shen *et al.*, 2005); Shen *et al.* (2008) publizierten kürzlich wiederholt den Einsatz

rekombinanter scFv in QCMs, von weiteren Einsätzen von rekombinanten scFv aus Phagen Display-Bibliotheken in QCMs wurde nicht berichtet. Von QCM-basierten Immunosensoren für die CRP-Detektion berichteten Aizawa *et al.* (2006). Antikörper wurden auf der Goldelektrode ebenfalls über einen *Self Assembled Monolayer* (SAM) immobilisiert. Hier wurden die Tests nicht in einem Fließsystem durchgeführt. Da die Quarzmikrowaage nach jedem Schritt getrocknet wurde, eignet sich dieses System nicht für den Einsatz bei einer *point of care* – Diagnostik. Doch nicht nur Quarzmikrowaagen können zur miniaturisierten Detektion von CRP eingesetzt werden. Neben der Verwendung von Oberflächenplasmonresonanz zur Detektion von CRP mittels SAM-Immobilisation der CRP-spezifischen Antikörper (Hu *et al.*, 2006) oder Immobilisation biotinylierter Antikörper über Streptavidin (Meyer *et al.*, 2006) ist es ebenfalls möglich, CRP mit Hilfe eines Cantilevers nachzuweisen (Lee *et al.*, 2004). Auf diesem „Federhebel“ sind CRP-spezifische Antikörper immobilisiert, lenkt dieser Hebel bei dem Abrastern einer Oberfläche aus, so kann dies detektiert werden. Bei diesen Systemen ist das Messen in einem Fließsystem und der Einbau in ein Komplettsystem im Gegensatz zu der mikrofluidischen Quarzmikrowaage nicht immer möglich. Ohne die Möglichkeit einer späteren Re-generation und Kalibrierung können Analyten in Blutserumproben auch mit antikörperkonjugierten magnetischen Nanopartikeln und einer magnetischen Permeabilitätsmessung detektiert werden, wie es für CRP-Messungen bereits gezeigt wurde (Kriz *et al.*, 2005). Dieser Test erfordert jedoch einen größeren Personalaufwand und ist bisher noch nicht automatisiert worden. Auf einer ähnlichen Messmethode basiert die Bestimmung von CRP mit Hilfe von magnetischen *Beads*. Es wurden biotinylierte anti-CRP-Antikörper über Avidin auf den *Beads* immobilisiert, parallel wurde ein weiterer CRP-Antikörper an der Oberfläche eines Filters immobilisiert, welcher im Reaktionsvolumen angebracht war. Die *Beads* wurden mit zwei magnetischen Feldern mit unterschiedlichen Frequenzen angeregt und ihre magnetische Reaktion in einer dritten Frequenz gemessen. Sind die *Beads* über das CRP mit der Filterwand verbunden, erzeugen sie ein anderes Signal, als wenn sie sich frei in Lösung befinden, worüber die Konzentration an CRP in der Lösung bestimmt werden kann (Meyer *et al.*, 2007). All diese vorgestellten Methoden erfüllen ebenfalls nicht den Anspruch eines mikrofluidischen regenerierbaren *point-of-care*-Diagnostiksystems.

Mit den in dieser Arbeit isolierten CRP-spezifischen scFv und der entwickelten Fließzelle jedoch ließ sich ein regenerierbarer, mikrofluidischer CRP-Mikrochip realisieren.

#### 4.5 Ausblick

Eine Erhöhung der Affinität und der Stabilität der CRP-spezifischen Antikörper ist durch Zufallsmutagenese in den Antikörper-Gensegmenten (Jung *et al.*, 1999) in Kombination mit einer erneuten Selektion unter stringenten Bedingungen möglich. Dafür kann eine geringere Antigenkonzentration eingesetzt werden, stringenter gewaschen oder ein Selektionsprotokoll unter Denaturierung der Antikörperphagen durchgeführt werden. Zu diesem Zweck wurden bereits Mutations-Bibliotheken mit den CRP-spezifischen Antikörperklonen mittels *error-prone*-PCR generiert. Mit diesen CRP-spezifischen Antikörpern könnte bei ausreichend hoher Affinität und Stabilität und bei dichter Beladung der Sensoroberfläche mit den Antikörpern ein Mikrosensor zur Quantifizierung von CRP entwickelt werden. Weiterhin erkennen die isolierten CRP-spezifischen Antikörper mindestens drei unterschiedliche Epitope auf nativem CRP, womit die Voraussetzung für ein Anreicherungsmodul in dem Chipsystem erfüllt werden, und damit auch die Detektion geringer Mengen CRP aus einer Blutserumprobe. Der Nachweis geringerer CRP-Mengen könnte sogar eine frühzeitige Prognose für Herz-Kreislauf-Erkrankungen, die mit einem nur leicht erhöhtem CRP-Wert einhergehen, ermöglichen.

Die CRP-spezifischen Antikörper erkennen natives CRP im *Sandwich*-ELISA, sowie adsorptiv gebundenes CRP. Weiterführende Studien könnten bestimmen, ob sie auch die denaturierte Konformation, das Neo-CRP, erkennen. Dazu könnte CRP mit Harnstoff partiell denaturiert werden, wobei CRP die Neo-Konformation annimmt (Potempa, 1987). Die CRP-spezifischen Antikörper könnten dann auf Bindung an Neo-CRP getestet werden. Für die Isolierung von Antikörperfragmenten, die ausschließlich natives CRP erkennen, könnte ein *Sandwich*-Panning durchgeführt werden. Dafür müsste CRP mittels eines Fängerantikörpers an eine Oberfläche immobilisiert werden und verbliebe somit in nativer Konformation. Die Selektion erfolgte dann mit gleichzeitiger Konkurrenz durch den Fängerantikörper, um Antikörperfragmente, die diesen binden, nicht anzureichern.

Die Kopplung CRP-spezifischer scFv als Fängermoleküle an die Goldoberfläche des Quarzmikrosensors wurde in goldbeschichteten Mikrotiterplatten optimiert. Da es hier bei Kontakt zu flüchtigen Lösungsmitteln teilweise zu einer Ablösung der Goldschicht kam sind weitere Kopplungsanalysen von scFv an Gold in alternativen Modellsystemen mit einer beständigeren Goldschicht notwendig.

Messungen mit reinen CRP-Lösungen wurden auf dem Quarzsensord bereits erfolgreich durchgeführt. Außerdem wurden bereits Vorbereitungen zu Messungen von CRP aus mit CRP-angereicherten Blutproben getroffen sodass die Integration in ein automatisches Vollblutanalyse-System als Ziel in der Entwicklung eines qualitativen Blutserum-Diagnostik-Chips eingeleitet wurde.

**Zusammenfassung**

Das C-reaktive Protein (CRP) ist ein wichtiger Marker für bakterielle Entzündungen und wird in der Blutserumdiagnostik zeit- und kostenaufwändig in Zentrallaboratorien bestimmt. Gleichzeitig besteht aber auch der Bedarf nach einem *point-of-care* Mikroanalysesystem für die schnelle CRP-Diagnostik unmittelbar am Patienten, beispielsweise während einer Operation, am Krankenhausbett oder auch zu Hause bei ambulanter Behandlung. Bisher entwickelte CRP-Diagnostiksysteme basieren auf CRP-spezifischen Antikörpern aus Hybridomzellen oder Immunbibliotheken. Dabei fehlen Untersuchungen zur Antikörperstabilität, ein entscheidender Parameter für die spätere Lagerung und Regenerierung des fertigen klinischen Analysesystems.

Die in dieser Arbeit aus den semisynthetischen Antikörpergen-Bibliotheken Tomlinson I und J isolierten CRP-spezifischen *single chain Fv* (scFv)-Antikörperfragmente sind für den Einsatz in mikrofluidische Analysesysteme geeignet. Sie wurden hinsichtlich Affinität und Stabilität sowie ihrer Antigenbindestelle (Epitop) charakterisiert und können aufgrund ihrer hohen Stabilität ohne signifikanten Funktionalitätsverlust für mehr als 2 Wochen bei 37 °C gelagert werden, besitzen eine hohe Affinität im nanomolaren Bereich ( $1,1 - 2,7 \times 10^{-8}$  M) und eignen sich für den qualitativen Nachweis von CRP mittels eines Fließsystems. Die hier isolierten und charakterisierten Antikörperfragmente erkennen spezifisch natives CRP als auch partiell denaturiertes Neo-CRP.

Die Implementierung der CRP-spezifischen Antikörper in den Quarz-Mikrosensor wurde hinsichtlich Antikörperformat, chemischer Kopplungsmethode und Absättigungsreagenz in goldbeschichteten Mikrotiterplatten optimiert, diese Parameter wurden bereits auf dem mikrofluidischen Quarzsensoren umgesetzt. Dabei erfolgten Messungen von reinen CRP-Lösungen auf dem Quarzmikrosensor, nach sechs Regenerationsschritten kam es weiterhin zu einer gleichbleibend sensitiven und spezifischen Detektion von CRP.

Mit diesen Messungen wurde erstmals der Einsatz CRP-spezifischer scFv-Antikörperfragmente aus einer semisynthetischen Antikörpergen-Bibliothek in einem Immunosensor, das wiederholte Messungen von CRP in einem konstanten Fluß ermöglicht, gezeigt. Damit gelang die erfolgreiche Isolation und zusätzliche Charakterisierung CRP-spezifischer Antikörperfragmente für die Entwicklung eines quarzbasierten Immunosensors, mit dem sich Blutserumanalysen direkt am Patienten mit einem geringem Zeitaufwand durchführen lassen können.

## Summary

C-reactive protein (CRP) is an important marker for bacterial infections. CRP determination is conducted in centralised laboratories, requiring much time at high costs. Hence, there is a great demand for a „point of care“ micro total analysis system ( $\mu$ TAS) for fast and immediate CRP diagnosis, e. g. during surgeries or as bedside tests. Known CRP diagnostic systems are based on antibodies derived from hybridoma cell lines or antibody gene immunolibraries. Until now no examinations concerning antibody stability – a crucial issue for handling and storage of the prefabricated diagnostic system - have been performed.

CRP-specific single chain Fv (scFv) were isolated from the semisynthetic antibody gene libraries Tomlinson I and J and can be applied in microfluidic analysis systems. They are characterised regarding affinity, stability and antigen binding site and can be stored for more than 2 weeks at 37 °C without loss of functionality due to their high stability. Additionally they are highly affine, with  $k_D$  values within the nanomolar range ( $1,1 - 2,7 \times 10^{-8}$  M) and are therefore suitable for qualitative determination of CRP via a flow system. The here isolated and characterised CRP-specific antibody fragments bind both native CRP and partial denatured Neo-CRP.

Implementation of CRP-specific antibodies into a quartz microsensor system are optimised in a gold coated microtitre plate model regarding to antibody format, bonding technology and blocking solution, furthermore the obtained parameters were transferred to the microfluidic quartz micro sensor. A minimum of 6 repetitive steps of CRP measurement followed by sensor regeneration were possible without loss of sensitivity or specificity.

Here, the application of CRP-specific scFv antibody fragments derived from a semisynthetic antibody gene library in an immunosensor was shown for repeatable measurements of CRP in a constant flow. With these measurements the isolation and additional characterisation of CRP-specific antibody fragments for the development of a quartz crystal immunosensor succeeded for fast blood serum analysis as a „point of care“ application.



## 5. Literaturverzeichnis

- Abe, M. u. a. Variable-region subgroup distribution among lambda-type immunoglobulins in normal human serum. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* **8**, 4-9 (1994).
- Ablij, H. & Meinders, A. C-reactive protein: history and revival. *European Journal of Internal Medicine* **13**, 412 (2002).
- Agrawal, A. u. a. Topology and structure of the C1q-binding site on C-reactive protein. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **166**, 3998-4004 (2001).
- Agrawal, A., Samols, D. & Kushner, I. Transcription factor c-Rel enhances C-reactive protein expression by facilitating the binding of C/EBPbeta to the promoter. *Molecular Immunology* **40**, 373-80 (2003).
- Aizawa, H., Kurosawa, S., Ogawa, K., Yoshimoto, M., Miyake, J., Tanaka, H. Conventional diagnosis of C-reactive protein in serum using latex piezoelectric immunoassay. *Sensors and Actuators B* **76**, 173-176 (2001).
- Aizawa, H., Gokita, Y., Park, J.-W., Yoshimi, Y. & Kurosawa, S. Antibody Immobilization on Functional Monolayers Using a Quartz Crystal Microbalance. *IEEE Sensors Journal* **6**, 5, 1052-1056 (2006).
- Ballou, S.P. & Lozanski, G. Induction of inflammatory cytokine release from cultured human monocytes by C-reactive protein. *Cytokine* **4**, 361-8 (1992).
- Barbas, C.F. u. a. Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 7978-82 (1991).
- Barbas C.F., Burton D.R., Scott J.K., Silverman G.J. Phage Display: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. (2001).
- Bird, R.E. u. a. Single-chain antigen-binding proteins. *Science (New York, N.Y.)* **242**, 423-6 (1988).
- Black, S., Kushner, I. & Samols, D. C-reactive Protein. *The Journal of Biological Chemistry* **279**, 48487-90 (2004).

- Breitling, F. & Dübel, S. Rekombinante Antikörper. *Spektrum Akademischer Verlag* (1997).
- Chames, P., Hoogenboom, H.R. & Henderikx, P. Antibody engineering. *Springer Lab Manual. Ed. Kontermann, Dübel* 149-166 (2001).
- Chowdhury, P.S. & Wu, H. Tailor-made antibody therapeutics. *Methods (San Diego, Calif.)* **36**, 11-24 (2005).
- Clackson, T. u. a. Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature* **352**, 624-8 (1991).
- Clearfield, M.B. C-reactive protein: a new risk assessment tool for cardiovascular disease. *The Journal of the American Osteopathic Association* **105**, 409-16 (2005).
- Cooper, M.A. & Singleton, V.T. A survey of the 2001 to 2005 quartz crystal microbalance biosensor literature: applications of acoustic physics to the analysis of biomolecular interactions. *Journal of Molecular Recognition: JMR* **20**, 154-84 (2007).
- Correia, L.C.L. u. a. Correlation between turbidimetric and nephelometric methods of measuring C-reactive protein in patients with unstable angina or non-ST elevation acute myocardial infarction. *Arquivos Brasileiros De Cardiologia* **81**, 133-6, 129-32 (2003).
- Davies, D.R. & Metzger, H. Structural basis of antibody function. *Annual Review of Immunology* **1**, 87-117 (1983).
- Dominici, R., Luraschi, P. & Franzini, C. Measurement of C-reactive protein: two high sensitivity methods compared. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* **18**, 280-4 (2004).
- Dörner, K. Klinische Chemie und Hämatologie, 3. überarbeitete Auflage. *Enke Ferdinand Verlag*. Stuttgart (1999).
- Du Clos, T.W. C-reactive protein reacts with the U1 small nuclear ribonucleoprotein. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **143**, 2553-9 (1989).
- Du Clos, T.W., Zlock, L.T. & Rubin, R.L. Analysis of the binding of C-reactive protein to histones and chromatin. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **141**, 4266-70 (1988).
- Edelman, G.M. Antibody structure and molecular immunology. *Science (New York, N.Y.)* **180**, 830-40 (1973).

- Edelman, G.M. & Gally, J.A. A model for the 7S antibody molecule. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **51**, 846-53 (1964).
- El-Ali, J., Sorger, P.K. & Jensen, K.F. Cells on chips. *Nature* **442**, 403-11 (2006).
- Esposito, S. u. a. Evaluation of a rapid bedside test for the quantitative determination of C-reactive protein. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine: CCLM / FESCC* **43**, 438-40 (2005).
- Ewert, S., Honegger, A. & Plückthun, A. Structure-based improvement of the biophysical properties of immunoglobulin VH domains with a generalizable approach. *Biochemistry* **42**, 1517-28 (2003).
- Fägerstam, L.G. u. a. Detection of antigen-antibody interactions by surface plasmon resonance. Application to epitope mapping. *Journal of Molecular Recognition: JMR* **3**, 208-14 (1990).
- Frank, R. und Dübel, S. Analysis of protein interactions with immobilized peptide arrays synthesized on membrane supports. *Protein-Protein Interactions, A Molecular Cloning Manual, 2nd edition, (E. Golemis, P. Adams, eds.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor* (2005).
- Gershov, D. u. a. C-Reactive protein binds to apoptotic cells, protects the cells from assembly of the terminal complement components, and sustains an antiinflammatory innate immune response: implications for systemic autoimmunity. *The Journal of Experimental Medicine* **192**, 1353-64 (2000).
- Gewurz, H., Zhang, X.H. & Lint, T.F. Structure and function of the pentraxins. *Current Opinion in Immunology* **7**, 54-64 (1995).
- Goding, J.W. Monoclonal Antibodies: Principles and Practice. *Academic Press, London* (1983).
- Goletz, S. u. a. Selection of large diversities of antiidiotypic antibody fragments by phage display. *Journal of Molecular Biology* **315**, 1087-97 (2002).
- Gray, W.R. Disulfide structures of highly bridged peptides: a new strategy for analysis. *Protein Science: A Publication of the Protein Society* **2**, 1732-48 (1993).
- Griffiths, A.D. u. a. Human anti-self antibodies with high specificity from phage display libraries. *The EMBO Journal* **12**, 725-34 (1993).

- Hahnefeld, C., Drewianka, S. & Herberg, F.W. Determination of kinetic data using surface plasmon resonance biosensors. *Methods in Molecular Medicine* **94**, 299-320 (2004).
- Hayashi, N. u. a. Simultaneous mutagenesis of antibody CDR regions by overlap extension and PCR. *BioTechniques* **17**, 310, 312, 314-5 (1994).
- Hayden, O., Bindeus, R. & Dickert, F. L. Combining atomic force microscope and quartz crystal microbalance studies for cell detection *Meas. Sci. Technol.* **14**, 1876–1881 (2003).
- Hengerer, A. u. a. Determination of phage antibody affinities to antigen by a microbalance sensor system. *BioTechniques* **26**, 956-60, 962, 964 (1999).
- Höffler, D. & Shah, P. C-reaktives protein - die diagnostische Reichweite. *Georg Thieme Verlag*, Stuttgart (1997).
- Hoogenboom, H.R. Designing and optimizing library selection strategies for generating high-affinity antibodies. *Trends in Biotechnology* **15**, 62-70 (1997).
- Hoogenboom, H.R. u. a. Antibody phage display technology and its applications. *Immunotechnology: An International Journal of Immunological Engineering* **4**, 1-20 (1998).
- Hu, W.P. u. a. Immunodetection of pentamer and modified C-reactive protein using surface plasmon resonance biosensing. *Biosensors & Bioelectronics* **21**, 1631-7 (2006).
- Husebekk, A. & Hansson, L.-O. C-reaktives Protein in Klinik und Praxis, 1. deutsche Auflage, *Axis-Shield PoC AS*. Oslo (2000).
- Hust, M. u. a. The production of a genus-specific recombinant antibody (scFv) using a recombinant potyvirus protease. *Journal of Virological Methods* **106**, 225-33 (2002).
- Hust, M. & Dübel, S. Mating antibody phage display with proteomics. *Trends in Biotechnology* **22**, 8-14 (2004).
- Hust, M., Toleikis, L. & Dübel, S. Antibody phage display. *Handbook of therapeutic antibodies*, Ed. Dübel, S., Wiley-VCH, 45-68 (2007).
- Huston, J.S. u. a. Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**, 5879-83 (1988).

Janeway, C.A. u.a. Immunologie. *Spektrum Akademischer Verlag*. Heidelberg (2002).

Janshoff, Galla & Steinem Piezoelectric Mass-Sensing Devices as Biosensors-An Alternative to Optical Biosensors? *Angewandte Chemie (International Ed. in English)* **39**, 4004-4032 (2000).

Jason-Moller, L., Murphy, M. & Bruno, J. Overview of Biacore systems and their applications. *Current Protocols in Protein Science / Editorial Board, John E. Coligan*. Chapter 19, Unit 19.13 (2006).

Jiang, Y. u. a. Self-assembled monolayers of dendron thiols for electrodeposition of gold nanostructures: toward fabrication of superhydrophobic/superhydrophilic surfaces and pH-responsive surfaces. *Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids* **21**, 1986-90 (2005).

Jung, S., Honegger, A. & Plückthun, A. Selection for improved protein stability by phage display. *Journal of Molecular Biology* **294**, 163-80 (1999).

Kato, T. u. a. Mammalian expression of single chain variable region fragments dimerized by Fc regions. *Molecular Biology Reports* **21**, 141-6 (1995).

Kim, S. u. a. Effects of PEGylated scFv antibodies against Plasmodium vivax duffy binding protein on the biological activity and stability in vitro. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **17**, 1670-4 (2007).

Kitagawa, J. u. a. Preparation and characterization of hetero-bifunctional cross-linking reagents for protein modifications. *Chem. Pharm. Bull.* **29**: 1130-5 (1981).

Knappik, A. u. a. Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides. *Journal of Molecular Biology* **296**, 57-86 (2000).

Köhler, G. & Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. 1975. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **174**, 2453-5 (2005).

Komissarov, A.A. u. a. Site-specific mutagenesis of a recombinant anti-single-stranded DNA Fab. Role of heavy chain complementarity-determining region 3 residues in antigen interaction. *The Journal of Biological Chemistry* **272**, 26864-70 (1997).

Kriz, K. u. a. Detection of C-reactive protein utilizing magnetic permeability detection based immunoassays. *Analytical Chemistry* **77**, 5920-4 (2005).

- Krykbaev, R.A. u. a. Phage display-selected sequences of the heavy-chain CDR3 loop of the anti-digoxin antibody 26-10 define a high affinity binding site for position 16-substituted analogs of digoxin. *The Journal of Biological Chemistry* **276**, 8149-58 (2001).
- Kurosawa, S., Aizawa, H. & Yoshimoto, M. Latex piezoelectric immunoassay: analysis of C-reactive protein in human serum. *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* **47**, 1256-8 (2000).
- Kurosawa, S., Aizawa, H., Tozuka, M., Nakamura, M & Park, J.-W. Immunosensors using a quartz crystal microbalance. *Meas. Sci. Technol.* **14** 1882–1887 (2003).
- Kurosawa, S. u. a. Evaluation of a high-affinity QCM immunosensor using antibody fragmentation and 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) polymer. *Biosensors & Bioelectronics* **20**, 1134-9 (2004).
- Kushner, I., Acute phase proteins. *UpToDate*, **9** No.3 (2001).
- Kyo, M., Usui-Aoki, K. & Koga, H. Label-free detection of proteins in crude cell lysate with antibody arrays by a surface plasmon resonance imaging technique. *Analytical Chemistry* **77**, 7115-21 (2005).
- Lander, E.S. u. a. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860-921 (2001).
- Lee, J.H. u. a. Label free novel electrical detection using micromachined PZT monolithic thin film cantilever for the detection of C-reactive protein. *Biosensors & Bioelectronics* **20**, 269-75 (2004).
- Leonard, P. u. a. High throughput ranking of recombinant avian scFv antibody fragments from crude lysates using the Biacore A100. *Journal of Immunological Methods* **323**, 172-9 (2007).
- Li, J. u. a. A comparative study of different vector designs for the mammalian expression of recombinant IgG antibodies. *Journal of Immunological Methods* **318**, 113-24 (2007).
- Liekefett, M. u. a. Miniaturised Quartz Crystal Microbalance (QCM) Array for Immunosensor Application. *Proceedings of Micro.tec* 299-304 (2003).
- Lin, S. u. a. Measurement of dimensions of pentagonal doughnut-shaped C-reactive protein using an atomic force microscope and a dual polarisation interferometric biosensor. *Biosensors & Bioelectronics* **22**, 323-7 (2006).

- Liu, Y.C., Wang, C.M. & Hsiung, K.P. Comparison of different protein immobilization methods on quartz crystal microbalance surface in flow injection immunoassay. *Analytical Biochemistry* **299**, 130-5 (2001).
- Liu, J. u. a. pPIC9-Fc: a vector system for the production of single-chain Fv-Fc fusions in *Pichia pastoris* as detection reagents in vitro. *Journal of Biochemistry* **134**, 911-7 (2003).
- Love, J.C. u. a. Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. *Chemical Reviews* **105**, 1103-69 (2005).
- Macintyre, S., Samols, D. & Dailey, P. Two carboxylesterases bind C-reactive protein within the endoplasmic reticulum and regulate its secretion during the acute phase response. *The Journal of Biological Chemistry* **269**, 24496-503 (1994).
- Malmborg, A.C. & Borrebaeck, C.A. BIAcore as a tool in antibody engineering. *Journal of Immunological Methods* **183**, 7-13 (1995).
- Marks, J.D. u. a. By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *Journal of Molecular Biology* **222**, 581-97 (1991).
- Marks, J.D. u. a. By-passing immunization: building high affinity human antibodies by chain shuffling. *Bio/Technology (Nature Publishing Company)* **10**, 779-83 (1992).
- McBride, J.D. & Cooper, M.A. A high sensitivity assay for the inflammatory marker C-Reactive protein employing acoustic biosensing. *Journal of Nanobiotechnology* **6**, 5 (2008).
- McCafferty, J. u. a. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* **348**, 552-4 (1990).
- McCarty, M. Historical Perspective on C-Reactive Protein. *Annals of the New York Academy of Sciences*, Issue: C-Reactive Protein and the Plasma Protein Response to Tissue Injury 389 1 – 10 (1982).
- Meyer, M.H.F., Hartmann, M. & Keusgen, M. SPR-based immunosensor for the CRP detection--a new method to detect a well known protein. *Biosensors & Bioelectronics* **21**, 1987-90 (2006).
- Meyer, M.H.F. u. a. CRP determination based on a novel magnetic biosensor. *Biosensors & Bioelectronics* **22**, 973-9 (2007).

- Michalzik, M., Wilke, R. & Büttgenbach, S. Miniaturized QCM-Based Flow System for Immunosensor Application in Liquid. *Proc. XVIII Eurosensors*. 275-276 (2004).
- Michalzik, M., Wendler, J., Rabe, J., Büttgenbach, S. & Bilitewski, U. Development and application of a miniaturised quartz crystal microbalance (QCM) as immunosensor for Bone Morphogenetic Protein-2. *Sensors and Actuators B*. 105, 508-515 (2005a).
- Michalzik, M., Wilke, R. & Büttgenbach, S. Miniaturized QCM-based flow system for immunosensor application in liquid. *Sensors and Actuators B*. 111-112, 410-415 (2005b).
- Michalzik, M., Balck, A., Al-Halabi, L., Hust, M., Dübel, S. & Büttgenbach, S., Massenfließsystem zur CRP-Diagnostik; *Proc. Mikrosystemteknikkongress* (2007).
- Mold, C. u. a. C-reactive protein mediates protection from lipopolysaccharide through interactions with Fc gamma R. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **169**, 7019-25 (2002).
- Moll, D. u. a. Biomolecular interaction analysis in functional proteomics. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)* **113**, 1015-32 (2006).
- Mollova S., Retter I. & Müller W. Visualising the immune repertoire. *BMC Systems Biology*, 1(Suppl 1):P30 (2007).
- Monsellier, E. & Bedouelle, H. Improving the stability of an antibody variable fragment by a combination of knowledge-based approaches: validation and mechanisms. *Journal of Molecular Biology* **362**, 580-93 (2006).
- Neubig, B. & Briesse, W. Das große Quarkkochbuch. *Franzis-Verlag*, Feldkirchen (1997).
- Nguyen, N.T. Mikrofluidik, *Teubner-Verlag*, Wiesbaden (2004).
- O'Brien, P.M. & Aitken, R. Broadening the impact of antibody phage display technology. Amplification of immunoglobulin sequences from species other than humans or mice. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* **178**, 73-86 (2002).
- Oshima, M. & Atassi, M.Z. Comparison of peptide-coating conditions in solid phase plate assays for detection of anti-peptide antibodies. *Immunological Investigations* **18**, 841-51 (1989).



- Park, J. u. a. Evaluation of 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine polymeric nanoparticle for immunoassay of C-reactive protein detection. *Analytical Chemistry* **76**, 2649-55 (2004).
- Parmley, S.F. & Smith, G.P. Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene* **73**, 305-18 (1988).
- Pini, A. u. a. Design and use of a phage display library. Human antibodies with subnanomolar affinity against a marker of angiogenesis eluted from a two-dimensional gel. *The Journal of Biological Chemistry* **273**, 21769-76 (1998).
- Porter, R.R. Structural studies of immunoglobulins. *Science (New York, N.Y.)* **180**, 713-6 (1973).
- Potempa, L.A. u. a. Expression, detection and assay of a neoantigen (Neo-CRP) associated with a free, human C-reactive protein subunit. *Molecular Immunology* **24**, 531-41 (1987).
- Powers, D.B. u. a. Expression of single-chain Fv-Fc fusions in *Pichia pastoris*. *Journal of Immunological Methods* **251**, 123-35 (2001).
- Retter, I. u. a. VBASE2, an integrative V gene database. *Nucleic Acids Research* **33**, D671-4 (2005).
- Rondot, S. u. a. A helper phage to improve single-chain antibody presentation in phage display. *Nature Biotechnology* **19**, 75-8 (2001).
- Rönmark, J. u. a. Construction and characterization of affibody-Fc chimeras produced in *Escherichia coli*. *Journal of Immunological Methods* **261**, 199-211 (2002).
- Sambrook J. & Russell D.W. In Molecular cloning: A Laboratory Manual, 3<sup>rd</sup> edition. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, New York (2001).
- Sanger, F. & Coulson, A.R. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology* **94**, 441-8 (1975).
- Schein, H. M. u. a. Transformation induced by simian virus 40 in human renal cell cultures. Morphology and growth characteristics. *PNAS* July 15; **48**:1164-72 (1962).
- Schirrmann, T., Al-Halabi, L., Dübel, S. & Hust, M. Production systems for recombinant antibodies. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library* **13**, 4576-94 (2008).

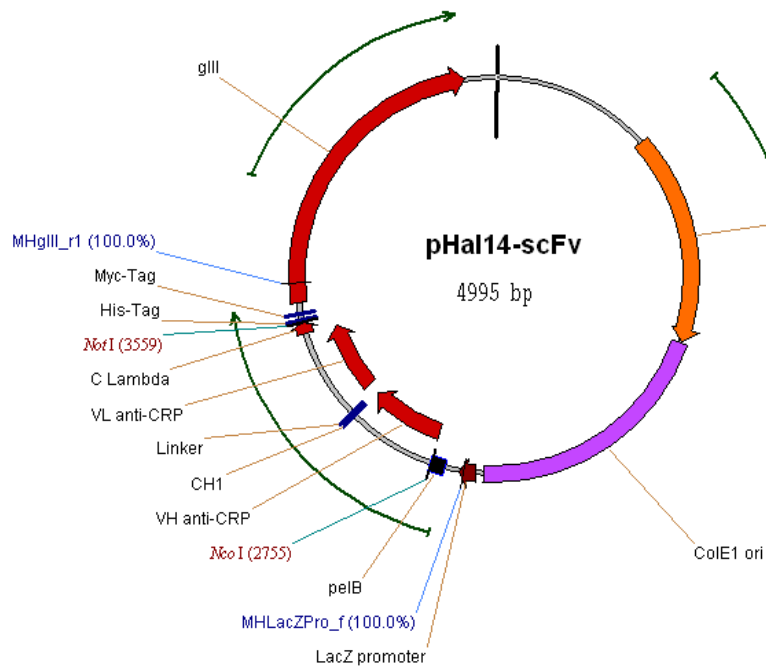
- Schofield, K.P. u. a. C-reactive protein concentration as a guide to antibiotic therapy in acute leukaemia. *Journal of Clinical Pathology* **35**, 866-9 (1982).
- Shen, Z. u. a. Single-chain fragment variable antibody piezoimmunosensors. *Analytical Chemistry* **77**, 797-805 (2005).
- Shen, Z. u. a. Engineering peptide linkers for scFv immunosensors. *Analytical Chemistry* **80**, 1910-7 (2008).
- Sinclair, A.M. & Elliott, S. Glycoengineering: the effect of glycosylation on the properties of therapeutic proteins. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **94**, 1626-35 (2005).
- Smith, G.P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science (New York, N.Y.)* **228**, 1315-7 (1985).
- Sota, H. u. a. A versatile planar QCM-based sensor design for nonlabeling biomolecule detection. *Analytical Chemistry* **74**, 3592-8 (2002).
- Steipe, B. u. a. Sequence statistics reliably predict stabilizing mutations in a protein domain. *Journal of Molecular Biology* **240**, 188-92 (1994).
- Storri, S. u. a. Surface modifications for the development of piezoimmunosensors. *Biosensors & Bioelectronics* **13**, 347-57 (1998).
- Szalai, A.J. & McCrory, M.A. Varied biologic functions of C-reactive protein: lessons learned from transgenic mice. *Immunologic Research* **26**, 279-87 (2002).
- Tejani, N.R. u. a. Use of C-reactive protein in differentiation between acute bacterial and viral otitis media. *Pediatrics* **95**, 664-9 (1995).
- Theisen, L.A., Martin, S.J. & Hillman, A.R. A model for the quartz crystal microbalance frequency response to wetting characteristics of corrugated surfaces. *Analytical Chemistry* **76**, 796-804 (2004).
- Thomas, L. Labor und Diagnose: Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik. *Th-Books Verlagsgesellschaft mbH*. Frankfurt/Main (1998).
- Thompson, D., Pepys, M.B. & Wood, S.P. The physiological structure of human C-reactive protein and its complex with phosphocholine. *Structure (London, England: 1993)* **7**, 169-77 (1999).

- Tilg, H. u. a. Antiinflammatory properties of hepatic acute phase proteins: preferential induction of interleukin 1 (IL-1) receptor antagonist over IL-1 beta synthesis by human peripheral blood mononuclear cells. *The Journal of Experimental Medicine* **178**, 1629-36 (1993).
- Tillet, W.S. & Francis, T. Serological reactions in pneumonia with a non-protein somatic fraction of the Pneumococcus. *J Exp Med*; 52:561-71 (1930).
- Uhlen, M. & Ponten, F. Antibody-based proteomics for human tissue profiling. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* **4**, 384-93 (2005).
- Van Droogenbroeck, B. u. a. Aberrant localization and underglycosylation of highly accumulating single-chain Fv-Fc antibodies in transgenic Arabidopsis seeds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 1430-5 (2007).
- Venter, J.C. u. a. The sequence of the human genome. *Science (New York, N.Y.)* **291**, 1304-51 (2001).
- Venugopal, S.K. u. a. Demonstration that C-reactive protein decreases eNOS expression and bioactivity in human aortic endothelial cells. *Circulation* **106**, 1439-41 (2002).
- Vieira, J. & Messing, J. Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods in Enzymology* **153**, 3-11 (1987).
- Vikholm-Lundin, I. & Albers, W.M. Site-directed immobilisation of antibody fragments for detection of C-reactive protein. *Biosensors & Bioelectronics* **21**, 1141-8 (2006).
- Villani, M.E. u. a. Humanization of a highly stable single-chain antibody by structure-based antigen-binding site grafting. *Molecular Immunology* **45**, 2474-85 (2008).
- Volanakis, J.E. Human C-reactive protein: expression, structure, and function. *Molecular Immunology* **38**, 189-97 (2001).
- Ward, M.D. & Buttry, D.A. In Situ Interfacial Mass Detection with Piezoelectric Transducers. *Science (New York, N.Y.)* **249**, 1000-1007 (1990).
- Wilkinson, K.A. u. a. Enhancement of the human T cell response to culture filtrate fractions of Mycobacterium tuberculosis by microspheres. *Journal of Immunological Methods* **235**, 1-9 (2000).

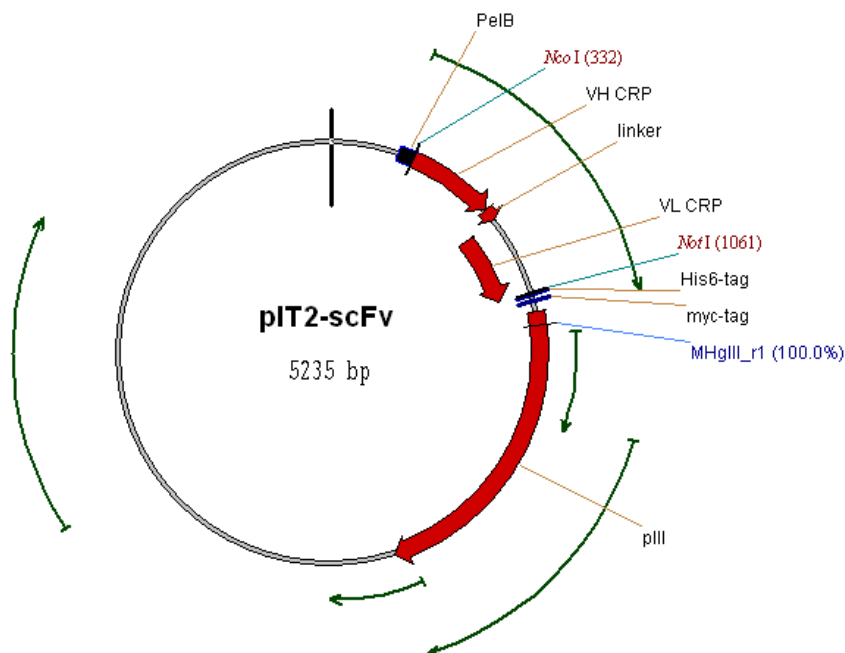
- Willats, W.G.T. Phage display: practicalities and prospects. *Plant Molecular Biology* **50**, 837-54 (2002).
- Winter, G. & Milstein, C. Man-made antibodies. *Nature* **349**, 293-9 (1991).
- Winter, C.-C. Chemische Dampfabcheidung von Gold, Kupfer und Aluminiumoxid auf selbstorganisierten Monolagen. Dissertation (2000).
- Wolbink, G.J. u. a. CRP-mediated activation of complement in vivo: assessment by measuring circulating complement-C-reactive protein complexes. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **157**, 473-9 (1996).
- Wörn, A. & Plückthun, A. Stability engineering of antibody single-chain Fv fragments. *Journal of Molecular Biology* **305**, 989-1010 (2001).
- Wu, T.T. & Kabat, E.A. An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity. *The Journal of Experimental Medicine* **132**, 211-50 (1970).
- Xia, Y. & Whitesides, G.M. Softlithographie. *Angewandte Chemie* **110**, 568-594 (1998).
- Yager, P. u. a. Microfluidic diagnostic technologies for global public health. *Nature* **442**, 412-8 (2006).
- Yang, G. u. a. Affinity maturation of an anti-hepatitis B virus PreS1 humanized antibody by phage display. *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)* **45**, 528-33 (2007).
- Ying, S.C. u. a. Identification and partial characterization of multiple native and neoantigenic epitopes of human C-reactive protein by using monoclonal antibodies. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **143**, 221-8 (1989).
- Yue, C.C. u. a. Identification of a C-reactive protein binding site in two hepatic carboxylesterases capable of retaining C-reactive protein within the endoplasmic reticulum. *The Journal of Biological Chemistry* **271**, 22245-50 (1996).

## 7. Anhang

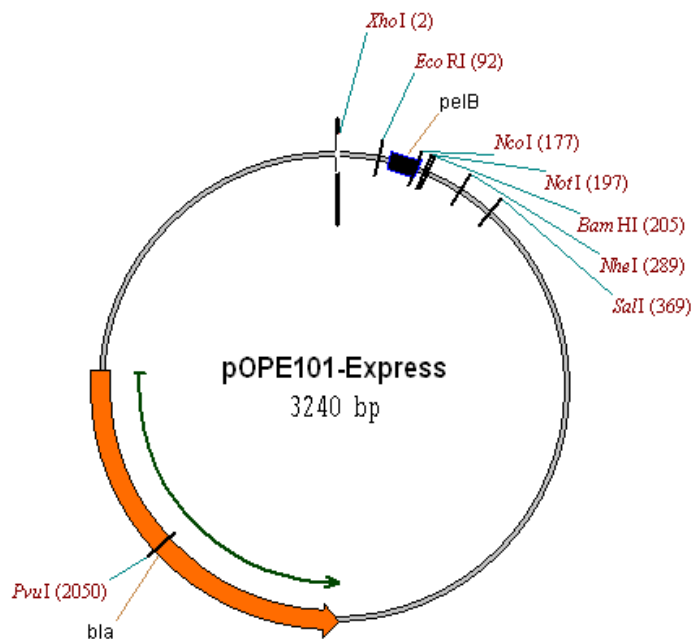
## 7.1 Vektorkarten



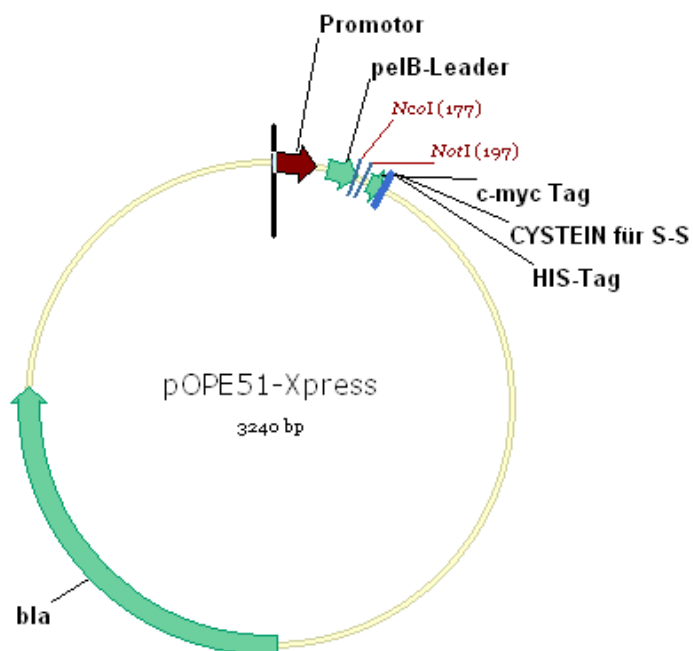
**Abb. 30: Vektorkarte von pHal14-scFv.** Der Phagemidvektor enthält folgende Merkmale: pelB-Signalsequenz, das Gen für die variable Region der schweren Kette (VH), eine Peptidlinkersequenz (Linker), das Gen für die variable Region der leichten Kette (VL), die cDNA für den His<sub>6</sub>-tag (His-Tag), die cDNA für (c)-myc (Myc-Tag), das Gen für das Phagenhüllprotein pIII (gIII), den Replikationsursprung für *E. coli* (ColE1 ori), das  $\beta$ -Laktamase-Gen (bla), Teile der konstanten Regionen von schwerer und leichter IgG-Kette (CH1 und C Lambda).



**Abb. 31: Vektorkarte von pIT2-scFv.** Der Phagemidvektor enthält folgende Merkmale: pelB-Signalsequenz, das Gen für die variable Region der schweren Kette (VH CRP), eine Peptidlinkersequenz (Linker), das Gen für die variable Region der leichten Kette (VL CRP), die cDNA für den His<sub>6</sub>-tag (His6-tag), die cDNA für (c)-myc (Myc-tag), das Gen für das Phagenhüllprotein pIII (pIII).



**Abb. 32: Vektorkarte von pOPE101-XP.** Der Expressionsvektor enthält folgende Merkmale: pelB-Signal-sequenz, die Restriktionsschnittstellen *NotI* und *NcoI* für die Subklonierung des scFv-Gens, das  $\beta$ -Laktamase-Gen (*bla*).



**Abb. 33: Vektorkarte von pOPE51-XP.** Der Expressionsvektor enthält folgende Merkmale: pelB-Signal-sequenz, die Restriktionsschnittstellen *NotI* und *NcoI* für die Subklonierung des scFv-Gens, das  $\beta$ -Laktamase-Gen (*bla*), die cDNA für (c)-myc (Myc-tag), die cDNA für dem modifizierten HIS-Tag (HIS-tag), sowie ein terminales Cystein für die Bildung von Disulfidbrücken.

## 7.2 Sequenzen der Peptidmembranen

Crpsc1:	QTDMSRKAFVFPKES	Crp2sc1:	MEKLLCFLVLTSLSH
	MSRKAFVFPKESDTS		LLCFLVLTSLSHAFG
	KAFVFPKESDTSYVS		FLVLTSLSHAFGQTD
	VFPKESDTSYVSLKA		LTSLSHAFGQTDMSR
	KESDTSYVSLKAPLT		LSHAFGQTDMSRKAF
	DTSYVSLKAPLTKPL		AFGQTDMSRKAFVFP
	YVSLKAPLTKPLKAF		QTDMSRKAFVFPKES
	LKAPLTKPLKAFTVC		MSRKAFVFPKESDTS
	PLTKPLKAFTVCLHF		KAFVFPKESDTSYVS
	KPLKAFTVCLHFYTE		VFPKESDTSYVSLKA
	KAFTVCLHFYTELSS		KESDTSYVSLKAPLT
	TVCLHFYTELSSTRG		DTSYVSLKAPLTKPL
	LHFYTELSSTRGYSI		YVSLKAPLTKPLKAF
	YTELSSTRGYSIFSY		LKAPLTKPLKAFTVC
	LSSTRGYSIFSYATK		PLTKPLKAFTVCLHF
	TRGYISIFSYATKRQD		KPLKAFTVCLHFYTE
	YSIFSYATKRQDNEI		KAFTVCLHFYTELSS
	FSYATKRQDNEILIF		TVCLHFYTELSSTRG
	ATKRQDNEILIFWSK		LHFYTELSSTRGYSI
	RQDNEILIFWSKDIG		YTELSSTRGYSIFSY
	NEILIFWSKDIGYSF		LSSTRGYSIFSYATK
	LIFWSKDIGYSFTVG		TRGYISIFSYATKRQD
	WSKDIGYSFTVGGSE		YSIFSYATKRQDNEI
	DIGYSFTVGGSEILF		FSYATKRQDNEILIF
	YSFTVGGSEILFEVP		ATKRQDNEILIFWSK
	TVGGSEILFEVPEVT		RQDNEILIFWSKDIG
	GSEILFEVPEVTVAP		NEILIFWSKDIGYSF

Crpsc1: ILFEVPEVTVAPVHI  
 EVPEVTVAPVHICTS  
 EVTVAPVHICTSWES  
 VAPVHICTSWESASG  
 VHICTSWESASGIVE  
 CTSWESASGIVEFWV  
 WESASGIVEFWVDGK  
 ASGIVEFWVDGKPRV  
 IVEFWVDGKPRVRKS  
 FWVDGKPRVRKSLKK  
 DGKPRVRKSLKKGYT  
 PRVRKSLKKGYTVGA  
 RKSLKKGYTVGAEAS  
 LKKGYTVGAEASIIL  
 GYTVGAEASIILGQE  
 VGAEASIILGQEQDS  
 EASIILGQEQDSFGG  
 IILGQEQDSFGGNFE  
 GQEQDSFGGNFEGSQ  
 QDSFGGNFEGSQSLV  
 FGGNFEGSQSLVGDI  
 NFEGSQSLVGDIGNV  
 GSQSLVGDIGNVNMW  
 SLVGDIGNVNMWDFV  
 GDIGNVNMWDFVLSP  
 GNVNMWDFVLSPDEI  
 NMWDFVLSPDEINTI  
 DFLVSPDEINTIYLG  
 LSPDEINTIYLGPF

Crp2sc1: LIFWSKDIGYSFTVG  
 WSKDIGYSFTVGGSE  
 DIGYSFTVGGSEILF  
 YSFTVGGSEILFEVP  
 TVGGSEILFEVPEVT  
 GSEILFEVPEVTVAP  
 ILFEVPEVTVAPVHI  
 EVPEVTVAPVHICTS  
 EVTVAPVHICTSWES  
 VAPVHICTSWESASG  
 VHICTSWESASGIVE  
 CTSWESASGIVEFWV  
 WESASGIVEFWVDGK  
 ASGIVEFWVDGKPRV  
 IVEFWVDGKPRVRKS  
 FWVDGKPRVRKSLKK  
 DGKPRVRKSLKKGYT  
 PRVRKSLKKGYTVGA  
 RKSLKKGYTVGAEAS  
 LKKGYTVGAEASIIL  
 GYTVGAEASIILGQE  
 VGAEASIILGQEQDS  
 EASIILGQEQDSFGG  
 IILGQEQDSFGGNFE  
 GQEQDSFGGNFEGSQ  
 QDSFGGNFEGSQSLV  
 FGGNFEGSQSLVGDI  
 NFEGSQSLVGDIGNV  
 GSQSLVGDIGNVNMW



Crpsc1:	DEINTIYLGGPFSPN	Crp2sc1:	SLVGDIGNVNMWDFV
	NTIYLGGPFSPNVLN		GDIGNVNMWDFVLSP
	YLGGPFSPNVLNWRA		GNVNMWDFVLSPDEI
	GPFSPNVLNWRALKY		NMWDFVLSPDEINTI
	SPNVLNWRALKYEVQ		DFVLSPDEINTIYLG
	VLNWRALKYEVQGEV		LSPDEINTIYLGGPF
	WRALKYEVQGEVFTK		DEINTIYLGGPFSPN
	LKYEVQGEVFTKPQL		NTIYLGGPFSPNVLN
	YEVQGEVFTKPQLWP		YLGGPFSPNVLNWRA
			GPFSPNVLNWRALKY
			SPNVLNWRALKYEVQ
			VLNWRALKYEVQGEV
			WRALKYEVQGEVFTK
			LKYEVQGEVFTKPQL
			YEVQGEVFTKPQLWP

**Tab. 12: Sequenzen der Spots auf den CRP-Peptidmembranen.** Mit Überhängen von je 3 Aminosäuren wurde die komplette Sequenz von humanen CRP als 15mere auf modifizierte Filtermembranen synthetisiert. Die Sequenzen sind in der Reihenfolge angegeben, in der sie auch auf die Membranen synthetisiert wurden.